



Université de Montréal

**Études de la réponse du métabolisme énergétique à la  
carence en fer dans les cultures cellulaires de *Solanum  
tuberosum***

par Marcela Paz Canelo Vivar

Sciences biologiques, Université de Montréal  
Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc)  
en Sciences Biologiques

Juillet, 2016

© Marcela Paz Canelo Vivar, 2016

# Résumé

Le fer est un micronutriment important pour la croissance et le développement des plantes. Il agit comme cofacteur pour plusieurs enzymes et il est important pour des processus tels que la photosynthèse et la respiration. Souvent, le Fe dans le sol n'est pas bio-disponible pour la plante. Les plantes ont développé des stratégies pour solubiliser le Fe du sol pour le rendre disponible et assimilable pour elles. Il y a deux stratégies, la première est caractéristique des dicotylédones et la seconde est caractéristique des monocotylédones. Le modèle utilisé dans cette étude est une culture cellulaire de *Solanum tuberosum*. Une partie de la recherche effectuée a permis la mesure d'activité et d'expression relative de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et la fourniture de précurseurs pour la synthèse d'ADN : la Nucléoside diphosphate kinase, la Ribonucléotide reductase, la Glucose 6-phosphate déshydrogénase et la 6-Phosphogluconate déshydrogénase dans les cellules en présence ou en absence de Fe. Chez certains organismes, la déficience en Fe est associée à une perte de croissance qui est souvent liée à une diminution de la synthèse d'ADN. Chez les cultures de cellules de *S. tuberosum*, les résultats indiquent que la différence de biomasse observée entre les traitements n'est pas due à une variation de l'activité ou l'expression relative d'une de ces enzymes. En effet, aucune variation significative n'a été détectée entre les traitements (+/- Fe) pour l'activité ni l'expression relative de ces enzymes. Une autre partie de la recherche a permis d'évaluer l'activité des voies métaboliques impliquées dans la stratégie 1 utilisée par *S. tuberosum*. Cette stratégie consomme des métabolites énergétiques: de l'ATP pour solubiliser le Fe et du pouvoir réducteur (NAD(P)H), pour réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . Des études de flux métaboliques ont été faites afin d'étudier les remaniements du métabolisme carboné en déficience en Fe chez *S. tuberosum*. Ces études ont démontré une baisse du régime dans les différentes voies du métabolisme énergétique dans les cellules déficientes en Fe, notamment dans le flux glycolytique et le flux de C à travers la phosphoenolpyruvate carboxylase. En déficience de Fe il y aurait donc une dépression du métabolisme chez *S. tuberosum* qui permettrait à la cellule de ralentir son métabolisme pour maintenir sa vitalité. En plus des flux, les niveaux de pyridines nucléotides ont été mesurés puisque ceux-ci servent à réduire le Fe dans la stratégie 1. Les résultats démontrent des niveaux élevés des formes réduites de ces métabolites en déficience de Fe. L'ensemble des résultats obtenus indiquent qu'en déficience de Fe, il y a une baisse du métabolisme permettant à la cellule de s'adapter et survivre au stress. .

**Mots-clés :** culture cellulaire, *Solanum tuberosum*, fer, déficience, stress, métabolisme carboné, métabolisme énergétique, flux glycolytique, flux anaplérotique

## Abstract

Iron is an important micronutrient for plant growth and development. It participates as a cofactor for several enzymes and is important for processes such as photosynthesis and respiration. Often soil Fe is not bioavailable to the plant. Plants have developed strategies to solubilize the Fe in the soil to make it available and easy to assimilate. There are two strategies, the first is characteristic of dicotyledones and the second is characteristic of monocotyledones. The model used in these studies is a cell culture of *Solanum tuberosum*. A first part of the research involved the study of expression and activity of enzymes required in energy metabolism and the provision of precursors for DNA synthesis: Nucleoside dehydrogenase, Ribonucleotide reductase, Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-Phosphogluconate dehydrogenase. In several organisms, Fe deficiency induces a loss of biomass which is often associated with a decrease in DNA synthesis. In *S. tuberosum* cell cultures, the results indicate that the loss of biomass observed in Fe deficiency is not linked to a change in the activity or relative expression of these enzymes. Indeed, no significant changes were detected between treatments (+/- Fe) for activity or relative expression. In another part of the research, we evaluated the activity of the metabolism pathways involved in strategy 1, which is used by *S. tuberosum*. This strategy consumes energetic metabolites: ATP to solubilize Fe and reducing power (NAD(P)H) to reduce the  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$ . Metabolic flux studies were done to investigate the alterations of carbon metabolism during Fe deficiency in *S. tuberosum*. These studies demonstrated that in Fe deficient cells, there is a decrease in the fluxes of some pathways of energy metabolism. Particularly, in the glycolytic flux and the anaplerotic flux of PEPC. Under Fe deficiency there would be a depression of metabolism in *S. tuberosum* which would allow the cell to slow its metabolism to maintain its vitality. In addition to the fluxes, the levels of pyridine nucleotides were measured since they serve to reduce Fe in the strategy 1. The results show an increase in the reduced forms of these metabolites during Fe deficiency. All results together point out that during Fe deficiency the metabolism decreases, allowing the cell to survive and adapt to the stress

**Keywords :** cell culture, *Solanum tuberosum*, iron, deficiency, stress, carbon metabolism, energetic metabolism, glycolytic flux, anaplerotic flux

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures .....	vi
Liste des sigles .....	viii
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xii
1. Introduction.....	1
1.1 Pourquoi s'intéresser à la carence en Fe chez les plantes? .....	1
1.2 Biodisponibilité du Fe.....	2
1.3 Stratégies d'acquisition du Fe.....	4
1.3.1 Stratégie 1 .....	5
1.3.2 Stratégie 2 .....	9
1.4 Métabolisme énergétique en carence de Fe – Stratégie 1 .....	11
1.4.1 Croissance cellulaire et enzyme impliquées dans la fourniture de précurseurs d'ADN.....	11
1.4.2 Le métabolisme Carboné et son remaniement en déficience de Fe .....	13
1.5 Présentation du projet de recherche .....	21
1.5.1 Problématique .....	21
1.5.2 Objectifs, résultats préliminaires et hypothèses.....	22
1.5.3 Matériel biologique.....	24
2. Matériel et méthodes.....	26
2.1 Matériel biologique, cultures cellulaires de <i>S. tuberosum</i> .....	26
2.2 Extraction des protéines et essais enzymatiques.....	26
2.2.1 6-PGDH .....	27
2.2.2 NDPK.....	27
2.3 Électrophorèse de protéines en conditions dénaturantes et immunodétection.....	28
2.4 Extraction et mesure du pool de pyridines nucléotides .....	29

2.4.1 Formes réduites .....	29
2.4.2 Formes oxydées .....	30
2.5 Mesure du flux de dégradation du saccharose .....	30
2.5.1 Détermination du poids frais par volume de culture et préparation des cellules pour le marquage .....	30
2.5.2 Marquage des cellules au [U- <sup>14</sup> C] Saccharose et détermination du flux de C entre le saccharose et le CO <sub>2</sub> .....	32
2.6 Mesure de la répartition du flux de carbone dans les fractions acide, neutre et basique	33
2.7 Mesure du flux anaplérotique de la PEPC .....	34
2.7.1 Détermination du poids frais par volume de culture.....	35
2.7.2 Préparation des cellules pour le marquage.....	35
2.5.3 Marquage des cellules au <sup>14</sup> CHNaO <sub>3</sub> .....	35
3. Résultats et discussion .....	37
3.1 Effets de la carence en Fe sur l'accumulation de biomasse, croissance cellulaire et sur l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse d'ADN .....	37
3.2 Métabolisme énergétique .....	48
3.2.1 Flux carbonés et répartition du carbone dans la cellule.....	48
3.2.2 Flux anaplérotique et expression de la PEPC en carence de Fe .....	55
3.2.3 Dosage des pyridines nucléotides en déficience de Fe .....	62
Conclusion .....	69
Bibliographie.....	i
Annexe 1 .....	i

## Liste des figures

Figure 1.	Distribution du carbone lors de la dégradation du saccharose radioactif..	31
Figure 2.	Cycle de Krebs.....	34
Figure 3.	Poids frais (a) et poids sec (b) par erlenmeyer de cultures cellulaires de <i>Solanum tuberosum</i> . Rapport poids frais sur poids sec (c).....	38
Figure 4.	Immuno-quantification de la G6PDH.....	40
Figure 5.	Activité et quantification de la 6-PGDH présente dans les cellules de <i>S. tuberosum</i> . .....	41
Figure 6.	Activité et quantification de la NDPK présente dans les cellules de <i>S. tuberosum</i> . en présence ou absence de Fe. ....	43
Figure 7.	Quantification de la RNR.....	44
Figure 8.	Effet d'un stress prolongé sur le poids frais et le niveau de la RNR. ....	45
Figure 9.	Immunodétection des protéines responsables de la fourniture des précurseurs pour la synthèse d'ADN dans les deux premiers jours du cycle de culture. ....	47
Figure 10.	Optimisation du marquage au saccharose radioactif ( $^{14}\text{C}$ )..	49
Figure 11.	Consommation du saccharose extracellulaire par des cellules de <i>S. tuberosum</i> ayant été cultivées en présence ou absence de Fe.....	51
Figure 12.	Flux de dégradation du saccharose en $\text{CO}_2$ dans les cellules de <i>S. tuberosum</i> ayant été cultivées en présence ou absence de Fe.....	51
Figure 13.	Rapport entre la quantité de C transportée sous forme de saccharose à partir du milieu et sa dégradation vers le $\text{CO}_2$ dans les cellules de <i>S. tuberosum</i> ayant été cultivées en présence ou absence de Fe .....	53
Figure 14.	Répartition du $^{14}\text{C}$ dans les portions acide, basique, neutre et dans le $\text{CO}_2$ pour les cellules de <i>S. tuberosum</i> en absence ou en présence. ....	54
Figure 15.	Exemple de production de $^{14}\text{CO}_2$ à partir du $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ lors de l'optimisation de la méthode de marquage isotopique.....	56
Figure 16.	Optimisation du marquage au $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ .....	57
Figure 17.	Flux anaplérotique de la PEPC des cellules de <i>S. tuberosum</i> ayant été cultivées en présence ou absence de Fe. ....	59

Figure 18.	Quantification de la PEPC par immunodétection. ....	60
Figure 19.	Mesures des pools de pyridines nucléotides intracellulaires en présence ou absence de Fe dans les cultures de <i>S. tuberosum</i> . ....	63
Figure 20.	Rapports des pools de $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ et $\text{NADP}+\text{NADPH}/\text{NAD}+\text{NADH}$ dans les cultures cellulaires de <i>S. tuberosum</i> en présence ou absence de Fe . ....	64
Figure Supplémentaire 1.	Quantification des cellules de <i>S. tuberosum</i> présentes dans les différentes phases du cycle cellulaire lors d'une analyse par cytométrie en flux. ....	i



## Liste des sigles

**2,4-D** : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique  
**6-PGDH** : 6-phosphogluconate déshydrogénase  
**ADH** : alcool déshydrogénase  
**ADM** : acide deoxymuginéique  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**ADN<sub>c</sub>** : ADN complémentaire  
**AOX** : alternative oxidase  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ARN<sub>m</sub>** : ARN messenger  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**BCIP** : 5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate  
**BPDS** : bathophenanthrolinedisulfonate  
**BSA** : Bovin Serum Albumin, albumine de sérum bovin  
**CCCP** : carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone  
**CS** : citrate synthase  
**DCPIP** : dichlorophenolindophenol  
**dNTP** : désoxynucléosides triphosphates  
**dpm** : désintégrations par minute  
**DTT** : dithiothréitol  
**E4P** : érythrose 4-phosphate  
**EDTA** : acide éthylène diamine tétraacétique  
**EtOH** : éthanol  
**ε-CA** : acide ε-amino caproïque  
**FAD** : flavine adenine dinucleotide  
**FADH<sub>2</sub>** : flavine adénine dinucléotide  
**FC-R** : Ferric-chelate reductase  
**FET** : ferric iron transporter  
**FIT** : Fe-deficiency induced transcription factor

**FRO** : Ferric reduction oxidase

**g** : unité de gravité

**G6P** : glucose 6-phosphate

**G6PDH** : glucose 6-phosphate déshydrogénase

**GAPDH** : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

**GOGAT** : glutamate synthase

**GS** : glutamine synthase

**H<sup>+</sup>-ATPase** : ATPase dépendante de protons H

**HEPES** : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine éthane sulfonate

**ICDH** : isocitrate déshydrogénase

**IgG**: immunoglobuline de type G

**IRT** : iron regulated transporter

**LDH** : lactate déshydrogénase

**m/v** : masse : volume

**MDH** : malate déshydrogénase

**MS** : Murashige et Skoog

**NA**: nicotianamine

**NAD<sup>+</sup>** : nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée

**NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite

**NADK** : NAD kinase

**NADP<sup>+</sup>** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme oxydé

**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite

**NBT** : nitro bleu tétrazolium

**NDPK** : nucléoside diphosphate kinase

**NTP** : nucléoside triphosphate

**OAA** : oxaloacétate

**PDC** : Pyruvate dehydrogenase complex

**PEM** : Potentiel électrique membranaire

**PEP** : phospho*enol*pyruvate

**PEPC** : phosphoénol pyruvate carboxylase

**PF** : poids frais

**Pi** : phosphate inorganique  
**PK** : pyruvate kinase  
**PMS** : phénazine méthosulfate  
**PMSF** : fluorure de phénylméthylsulfonyl  
**PPi** : anion pyrophosphate  
**PPi-PFK** : phosphofructokinase dépendante de PPi  
**PVPP** : polyvinylpyrrolidone  
**R5P** : ribose 5-phosphate  
**RER** : réticulum endoplasmique rugueux  
**RNR** : ribonucléotide réductase  
**ROS** : Reactive Oxygen Species, dérivés réactifs d'oxygène  
**RPM** : rotation par minute  
**RT-PCR** : Real-Time Polymerase Chain Reaction  
**SHAM** : Salicylhydroxamic acid, acide salicylhydroxamique  
**TBST** : tampon tris salin avec du tween 20  
**TDP** : thymidine diphosphate  
**TPI** : Triose phosphate isomérase  
**v/v** : volume/volume  
**VPP** : Voie de pentoses phosphates  
**YS** : yellow stripe  
**YSL** : yellow stripe-like  
**ZIP** : Zrt/Irt-like proteins  
 **$\alpha$ -CG** : cétoglutarate  
 **$\alpha$ -CGDH** : complexe  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase

## Liste des abréviations

et al. : et alii

Etc : et cætera

Fig. : figure

Hre : heure

i.e. : id est

Min. : minute

Prot. : protéine

Tris : tris(hydroxyméthyl)amionméthane

## Remerciements

J'aimerais remercier avant tout, mon directeur de recherche Jean Rivoal, pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire, d'avoir été présent dans toutes les étapes de la conception et réalisation du projet et finalement pour son soutien tout au long de cette aventure. Il en a vu de toutes les couleurs avec mon projet, et il a été très patient, merci pour tout!

Je poursuis en remerciant Sonia et mes collègues dans le laboratoire, Jiang Zhou et Sébastien. Sonia qui n'hésite jamais à porter son aide en cas de difficulté et partager tout son savoir avec les étudiants qui entrent au laboratoire. Ses enseignements m'ont été fort utiles pour effectuer toutes les expériences durant mes études et son optimisme d'autant plus. Jiang Zhou et Sébastien m'ont également bien aidé avec leur soutien et tous les conseils qu'ils m'ont donné. Ils m'ont particulièrement soutenu dans les moments difficiles en me signalant qu'en science, il est normal que les expériences ne marchent pas du premier coup, ni du second. Merci!

Je remercie également Mathieu Beauchemin pour ses conseils pour l'écriture de ce mémoire et aussi pour ses encouragements pendant mes études.

Finalement, je remercie ma famille et amis. Mes parents qui n'ont jamais douté de mes capacités et qui ont été toujours là pour moi. Mon frère qui ne comprend rien au baratin que je raconte, quand je lui parle de mon projet, mais qui m'écoute tout de même et qui m'encourage en tout moment. À tous mes amis que je vois moins en période scolaire et qui me comprennent et me soutiennent à fond, particulièrement mon ami François Lambert, un gros merci pour tes conseils, tes encouragements et ces moments où on a discuté de nos derniers moments aux études.

# **1. Introduction**

## **1.1 Pourquoi s'intéresser à la carence en Fe chez les plantes?**

La carence en Fe est bien connue pour ses effets chez les animaux, en particulier chez l'homme. En effet, la carence en Fe qui est causée par un apport insuffisant de Fe dans l'alimentation est l'une des carences nutritionnelles les plus répandues dans le monde. Elle entraîne souvent l'anémie. Cette maladie affecte des hommes et des femmes de tous âges, bien que certains groupes puissent être plus à risque. Par exemple, les enfants, dont le développement cognitif peut présenter certaines complications en carence de Fe (Clark, 2008). Dès qu'une personne est diagnostiquée avec une carence en Fe, la première chose recommandée est de changer de diète afin de manger plus d'aliments contenant de Fe (Clark, 2008). Pour des raisons économiques ou culturelles, les produits végétaux de l'agriculture sont une grande, sinon la plus importante source de Fe dans certains pays. Il est important que ces sources alimentaires contiennent un taux élevé en Fe. Or, les plantes elles aussi peuvent présenter des carences en Fe. Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé, une alimentation en produits végétaux carencés en Fe est la cause majeure d'anémie dans le monde, touchant plus d'un milliard d'individus, en particulier les enfants en bas âge et les femmes enceintes des pays en voie de développement (Harvest Plus, 2010). Les recherches menées sur la physiologie des plantes concernant le manque de Fe sont donc justifiées puisqu'elles pourraient, à terme, permettre d'améliorer la biodisponibilité du Fe dans l'alimentation humaine à travers des manipulations génétiques des espèces cultivées (biofortification). Cela pourrait également aider à développer des plantes adaptées à la culture sur les sols déficients en Fe.

En effet, au cours de leur évolution, les plantes ont été exposées à de nombreux stress abiotiques auxquels elles ont dû s'adapter pour survivre. La carence en Fe en fait partie. L'approvisionnement en Fe par la plante est très important puisque celui-ci est un cofacteur qui se trouve dans plusieurs enzymes. Par exemple, on trouve des groupes hèmes dans les protéines comme la catalase et les peroxydases qui sont utiles pour la synthèse de lignine (Osorio Vega, 2007), une composante de la paroi qui la rigidifie la rendant plus résistante aux

attaques pathogènes. Le Fe est présent dans plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire, il est donc très important pour le métabolisme carboné (Vigani et al., 2009). Également, puisqu'il est une composante de plusieurs transporteurs d'électrons de la mitochondrie et du chloroplaste, le Fe est essentiel à la formation de la plus grande partie de l'ATP dans la cellule.

Le Fe est également important pour la synthèse de désoxyribonucléotides, les précurseurs de l'ADN. On trouve des atomes de Fe dans l'enzyme RNR (Ribonucléotide Réductase) qui est responsable de la synthèse *de novo* des désoxyribonucléotides (Pham et al., 2002, Thelander & Reichard, 1979). De ce fait, la RNR permet la réplication d'ADN et sa réparation. Cette enzyme a été étudiée principalement chez la levure lors de la déficience en Fe, où son activité augmente, mais on connaît peu les mécanismes exacts qui régulent son activité (Sanvisens et al., 2011)

## 1.2 Biodisponibilité du Fe

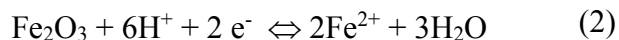
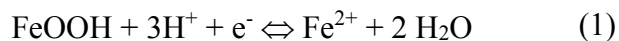
Les racines sont en contact avec le sol qui contient les éléments nécessaires au développement et à la croissance de la plante. Parmi ces éléments, on trouve le Fe qui fait partie des micronutriments indispensables à la plante (Fe, Mn, B, Cl, Zn, Cu, Mo) (Hell & Stephan, 2003). Contrairement à certains macronutriments comme le phosphore ou l'azote, le Fe est un micronutriment très abondant dans le sol (6 % de la totalité des minéraux présents dans le sol). Cependant, il n'est pas souvent disponible pour la plante (Hell & Stephan, 2003) car il est souvent trouvé sous forme insoluble (Guerinot, 2001). Dans le sol, le Fe est en effet majoritairement sous la forme ferrique  $[\text{Fe}^{3+}]$  qui forme des complexes insolubles d'oxyhydroxides tels que l'hématite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ou la goethite ( $\text{FeOH}$ ) (Osorio Vega, 2007) produits par la dégradation et le lessivage des roches (Guerinot & Yi, 1994). De ce fait, les plantes peuvent souvent se trouver en carence de Fe.

On peut trouver le  $\text{Fe}^{3+}$  à des concentrations de  $10^{-6}$  M dans un pH acide (3,3) et dans un sol à pH physiologique de 7, ces concentrations peuvent descendre jusqu'à  $10^{-17}$  M (Guerinot & Yi, 1994). Cependant, les plantes en ont besoin dans une gamme allant jusqu'à  $10^{-4}$  M, ce qui représente des quantités bien au-dessus de ce qu'elles ont généralement à leur disposition (Hell & Stephan, 2003).

Il existe plusieurs raisons pour lesquelles le Fe n'est pas soluble dans le sol. La forme soluble de Fe est sous forme ionisée (cationique) (Viets Jr, 1962). Étant donné que le Fe est chargé positivement, il est possible que celui-ci soit adsorbé par le sol; l'argile et l'humus étant chargés négativement, l'attraction entre charges opposées mène à une adsorption forte du cation  $\text{Fe}^{3+}$  dans le sol (Viets Jr, 1962). La plante peut alors avoir de la difficulté à acquérir les cations de Fe dont elle a besoin pour son développement.

Il y a d'autres phénomènes qui limitent la solubilité du Fe dans le sol, parmi ceux-ci, on peut citer le niveau d'aération, le pH et la composition du sol. Dans un sol bien aéré et où le pH est élevé, le Fe est sous sa forme insoluble (Guerinot, 2001). La raison principale est que l'oxygène oxyde le Fe le rendant indisponible (Osorio Vega, 2007). La solubilité du Fe diminue avec des valeurs de pH élevés également parce que ces conditions favorisent la condensation et la précipitation avec des anions inorganiques (Hell & Stephan, 2003).

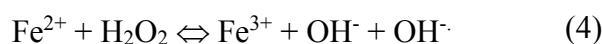
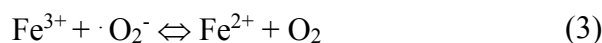
Un autre facteur pouvant affecter la disponibilité du Fe est la présence de communautés microbiennes dans le sol, en effet, les bactéries du sol peuvent, elles aussi, relâcher des substances qui chélatent le Fe afin de l'assimiler. Cependant, la substance chélatrice est spécifique, assurant ainsi l'absorption du Fe uniquement à l'organisme produisant la dite substance chélatrice (Osorio Vega, 2007). Aussi, les bactéries peuvent produire des réactions d'oxydoréduction qui affecteront l'état du Fe dans le sol (Osorio Vega, 2007). Les bactéries de la rhizosphère, telles celles des groupes *Bacillus* et *Pseudomonas*, peuvent réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ , forme assimilable par les plantes (Osorio Vega, 2007), cette réduction a besoin des protons et des électrons pour que les réactions suivantes aient lieu;



De plus, un sol riche en microorganismes aura tendance à contenir peu d'oxygène. La respiration de ces bactéries augmentera le taux d'utilisation de l'oxygène, diminuant l'oxygène dans le sol et y augmentant le taux de  $\text{CO}_2$  (Osorio Vega, 2007). Dans ces conditions anaérobiques, les réactions de réduction sont favorisées (Osorio Vega, 2007).



En agriculture et en horticulture, on ajoute souvent des agents chélateurs, comme l'EDTA, dans les solutions utilisées pour arroser les plantes, mais il faut utiliser les bonnes concentrations, car il est possible que les quantités de Fe alors disponibles surpassent celles dont la plante a besoin ce qui produira des conditions toxiques pour celle-ci (Viets Jr, 1962). Une fois dans la plante, le Fe est chélaté et transporté à travers la plante aux endroits où elle en a besoin (Schmidt, 2003b). Dans le cas où le Fe ne serait pas chélaté, celui-ci peut catalyser des réactions menant à la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (équations 3-5) (Guerinot & Yi, 1994). Parmi les ROS produits, il y a l'ion hydroxyle, qui peut réagir avec plusieurs macromolécules (ADN, lipides, protéines, sucres) et produire des dommages cellulaires (Hell & Stephan, 2003).



### 1.3 Stratégies d'acquisition du Fe

Nous venons de voir que la solubilité limitée du Fe dans le sol est un facteur important qui restreint sa biodisponibilité, nous allons maintenant aborder les stratégies d'acquisition du Fe développées par les plantes afin d'assurer leur approvisionnement en Fe en condition de carence. On classe les plantes selon deux stratégies d'acquisition du Fe, désignées 1 et 2. La première stratégie se fait en trois étapes, soit l'acidification du milieu, la réduction du Fe et son internalisation. La seconde stratégie ne requiert que deux étapes, la chélation par des phytosidérophores suivie par l'internalisation du Fe. De façon générale, les dicotylédones sont des plantes à stratégie 1 et les monocotylédones, des plantes à stratégie 2. Dans le présent document, les deux stratégies seront présentées.

Au cours de ma maîtrise, j'ai travaillé avec des cultures cellulaires de *Solanum tuberosum* (pomme de terre), une dicotylédone, c'est pourquoi dans les sections suivantes on abordera surtout les réponses liées à la stratégie 1. Le matériel biologique utilisé sera présenté aussi plus en détail, dans une des prochaines sections.

### 1.3.1 Stratégie 1

#### Première étape - Acidification

Comme il vient d'être mentionné, les plantes à stratégie 1 utilisent communément un système en trois étapes; (I) acidification du sol, (II) réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  et (III) internalisation du  $\text{Fe}^{2+}$  (Schmidt, 2003b). Les cellules de l'épiderme racinaire possèdent des pompes à protons ATP-dépendantes leur permettant d'acidifier leur milieu (Römheld et al., 1984, Ohwaki & Sugahara, 1997). L'acidification du milieu se fait uniquement si les cellules se retrouvent dans un milieu pauvre en Fe et si elles n'ont plus de réserves en Fe. Elle peut être déclenchée très rapidement, soit quelques heures seulement après le stress (Landsberg, 1986). Cependant, il est possible que les racines des plantes croissant dans un milieu déficient en Fe n'acidifient pas le milieu (Zocchi & Cocucci, 1990, Zocchi et al., 2007, Römheld et al., 1984, de Vos et al., 1986). Par exemple, lorsque des plants de concombre ayant des réserves suffisantes en Fe sont mis en situation de déficience, les racines n'acidifient pas le milieu, même après des heures de stress. Les cellules utilisent leurs réserves et ne sont pas en carence (Zocchi & Cocucci, 1990)

L'extrusion de protons par les racines vers la rhizosphère (région du sol en contact avec les racines et les microorganismes qui y sont associés) cause une acidification de cette dernière. (de Vos et al., 1986). Cette baisse du pH dans la rhizosphère permet de rendre le Fe disponible, car il est solubilisé (Rabotti et al., 1995, Ohwaki & Sugahara, 1997). Il est possible de visualiser l'acidification du milieu de culture en utilisant la technique de coloration selon le pH. Römheld et al. (1984) ont fait des études sur le tournesol et ont pu observer que l'extrusion de protons se fait au niveau apical de la racine. Les résultats obtenus suggèrent également que l'excrétion de protons est environ 6 fois plus rapide en carence de Fe (10 à 20 premières minutes de stress) que chez le contrôle (suffisance de Fe).

L'activité de l'ATPase responsable du pompage de protons est corrélée à la diminution du PEM (Potentiel Électrique Membranaire). Le PEM devient plus négatif lorsque les protons sont expulsés dans la rhizosphère par l'ATPase à  $\text{H}^+$  (Zocchi & Cocucci, 1990) ce qui facilite l'entrée des micronutriments. Une fois réduit, le  $\text{Fe}^{2+}$  peut facilement entrer dans la cellule; le PEM étant plus négatif attire les cations (Zocchi & Cocucci, 1990, Rabotti & Zocchi, 1994)

Des enzymes utilisant le NADH sont aussi induites en carence de Fe, telles que la LDH (Lactate déshydrogénase) et l'ADH (Alcool déshydrogénase), toutes deux des enzymes du métabolisme anaérobie (López-Millán et al., 2000b, Thimm et al., 2001). La réaction enzymatique de la LDH qui est responsable de la formation d'acide lactique produit des protons et la diminution du pH qui peut suivre active l'ATPase à  $H^+$ . Les protons peuvent également être utilisés par l'ATPase membranaire afin d'acidifier le milieu (Rabotti et al., 1995). L'augmentation de l'activité de l'ATPase à  $H^+$ , et par le fait même de la consommation d'ATP, pourrait être accompagnée, lors d'une déficience de Fe, d'une augmentation de l'activité du métabolisme carboné, ce qui pourrait permettre d'augmenter la quantité d'ATP produite (López-Millán et al., 2000b, Li et al., 2008, Vigani, 2012). L'augmentation de l'ATP assure ainsi une augmentation de l'efficacité de l'excrétion des protons (Esen et al., 2000).

Dans les racines déficientes en Fe du concombre l'activité de l'ATPase à  $H^+$  augmente de 30 % (Zocchi & Cocucci, 1990) et elle peut même aller jusqu'à doubler (Rabotti & Zocchi, 1994). Ceci s'explique par le fait qu'en carence de Fe, la transcription et la traduction de l'enzyme augmentent (Thimm et al., 2001, Rellan-Alvarez et al., 2010). Au niveau racinaire, la vitesse d'expulsion de protons est corrélée à la formation de cellules de transfert qui sont des cellules avec un grand nombre de mitochondries, de RER (réticulum endoplasmique rugueux), des ratios cytoplasme/vacuole élevés et des repliements au niveau de la paroi (Schmidt & Bartels, 1996, Römhelt et al., 1984). L'augmentation de cellules de transfert augmente la surface capable d'acidifier le milieu (Römhelt et al., 1984, Ohwaki & Sugahara, 1997). De plus, l'acidification peut être régulée en fonction des formes de Fe présentes dans le milieu. Il a été démontré que l'acidification est inhibée en présence de  $Fe^{2+}$  (Zocchi & Cocucci, 1990, Rabotti & Zocchi, 1994), ce qui indique qu'il y aurait un mécanisme de régulation dans le cytoplasme par la concentration de  $Fe^{2+}$  (Zocchi & Cocucci, 1990).

## **Deuxième étape - Réduction**

Suite à l'acidification du milieu pour solubiliser le Fe, il y a réduction de celui-ci pour permettre son internalisation. C'est une réductase membranaire qui fait cette réaction au niveau du rhizoderme (Landsberg, 1986). Chez *A. thaliana*, deux isoformes de la réductase ont

été identifiées par homologie de séquences les gènes FRO (*Ferric Reduction oxidase*): FRO1 et FRO2 (Robinson et al., 1999). FRO2 est celui qui est plus spécifiquement exprimé en carence de Fe (Wintz et al., 2003). Des analyses par RT-PCR montrent que le gène codant pour FRO2 est exprimé en carence, alors que celui de FRO1 semble être exprimé de façon équivalente en conditions suffisantes et déficientes. Ce dernier est donc responsable de l'expression constitutive de la réductase (Robinson et al., 1999).

FRO2 a huit domaines transmembranaires dont quatre sont associés à la structure de la superfamille des flavocytochromes, indiquant que la réductase fait partie de cette famille de protéines membranaires (Robinson et al., 1999, Schagerlof et al., 2006). La réductase contient un domaine de liaison au FAD et également des résidus histidines transmembranaires (dans les domaines V et VII) (Schagerlof et al., 2006). Ces histidines sont organisées de façon similaire à celles de la réductase de la levure qui sont connues pour coordonner des groupes hèmes (Finegold et al., 1996). L'utilisation des pyridines nucléotides comme source d'électrons est en accord avec l'étude menée chez *Phaseolus vulgaris* L. (Sijmons et al., 1984a). Les chercheurs ont étudié la dépolarisation de la membrane due à un transfert d'électrons à travers la membrane en carence de Fe. Ils suggéraient à l'époque qu'il y a transfert d'électrons à travers la membrane provenant notamment du pool cellulaire des pyridines nucléotides.

Chez la racine de concombre, il a été démontré que plusieurs enzymes impliquées dans la production de pouvoir réducteur (NAD(P)H) augmentaient en condition de carence de Fe (Rabotti et al., 1995). Il est possible que la source de pouvoir réducteur soit seulement l'une de ces deux formes, en effet le NADH être plus utilisé par la FC-R (*Ferric-chelate Reductase*) que le NADPH (Rabotti & Zocchi, 1994). La réductase de Fe a une activité optimale à pH 5, mais à pH 7 la vitesse de réduction est tout de même rapide. Étant donné que l'activité optimale se situe à des faibles pH (Sijmons et al., 1984a), l'acidification du milieu par l'ATPase à H<sup>+</sup> favoriserait la réduction du Fe par la réductase (Römheld & Marschner, 1983). La nature du composé chélatant utilisé est un autre facteur qui influence la réduction du Fe<sup>3+</sup> par la réductase. Chez le concombre, la vitesse de réduction peut diminuer de plus de la moitié ou augmenter presque trois fois plus qu'en conditions normales dépendamment du composé chélatant le Fe tels le (CN)<sub>6</sub>, l'EDTA ou le citrate (Rabotti & Zocchi, 1994). Les concentrations de ces chélatants peuvent également affecter l'efficacité de la réduction; des

concentrations de l'ordre de  $10^{-4}$  et  $10^{-3}$  M seraient idéales pour favoriser la réduction (Römheld & Marschner, 1983). Chaney et al. (1972) ont étudié la réduction du Fe dans des plants de soja. Pour ce faire, ils ont utilisé différents chélateurs et un agent séquestrant le Fe, le BPDS. Ils ont vu que la réduction se fait sous forme chélatée et que celle-ci cause la séparation du Fe et du chélat. Le  $\text{Fe}^{2+}$  est alors internalisé dans la cellule, prouvant ainsi que la réduction est essentielle pour assimiler le Fe (Chaney et al., 1972). Les études de Robinson (1999) confirment également que la réduction est nécessaire pour l'internalisation, puisque chez les mutants des réductases, leur contenu en Fe est faible comparativement au type sauvage.

### Troisième étape - Internalisation

Une fois le Fe réduit, il peut être internalisé dans la cellule via un transporteur, IRT1 (*Iron-regulated Transporter*), chez *A. thaliana* (Eide et al., 1996). La stratégie pour internaliser le Fe chez les plantes à stratégie 1 ressemble beaucoup à celle utilisée par la levure *S. cerevisiae* (Eide et al., 1996). Chez *S. cerevisiae*, il y a deux transporteurs identifiés, FET3 (*Ferric iron Transporter 3*) et FET4 (*Ferric iron Transporter 4*) (Dix et al., 1994). FET4 est induit en carence de Fe, alors que FET3 semble être un transporteur constitutif qui est faiblement exprimé en carence et en suffisance de Fe (Dix et al., 1994). Eide et al. (1996) ont utilisé un double mutant, *fet3fet4*, qui ne survit pas en carence de Fe (Dix et al., 1994) pour trouver les gènes orthologues du transporteur chez *A. thaliana*. Ils ont criblé une banque d'ADNc afin de trouver les séquences qui restaureraient le phénotype mutant. Deux isoformes ont été trouvées, IRT1 et IRT2, et ont été classées comme des transporteurs appartenant à la famille ZIP (*Zrt/Irt-like Proteins*). Les transporteurs de la famille ZIP peuvent internaliser des cations, tels que le zinc, le Fe et le cuivre, autant au niveau des racines que des feuilles (Wintz et al., 2003). IRT1 et IRT2 peuvent transporter d'autres métaux, mais leur affinité pour le Fe est plus grande. Pour le transporteur IRT1, chez *A. thaliana*, le  $K_m$  est de  $6 \pm 1 \mu\text{M}$  (Eide et al., 1996).

Suite à cette découverte chez *A. thaliana*, des études similaires furent menées sur la tomate (*Solanum lycopersicum*) et ont permis d'isoler deux transporteurs de Fe similaires; LeIRT1 et LeIRT2 (Eckhardt et al., 2001). Ils ont la structure de base de transporteurs de métal de la famille ZIP, soit huit domaines transmembranaires et une séquence « signature »

de cette famille (Eckhardt et al., 2001). L'expression de LeIRT1 est exclusive au système racinaire et augmente énormément en carence de Fe (Eckhardt et al, 2001). De plus, elle est corrélée à celle de la réductase. LeIRT2 est faiblement exprimé dans les racines autant en carence qu'en suffisance de Fe. Comme mentionné précédemment, le Fe doit donc être réduit pour être assimilé (Yi et Guerinot, 1996). Que ce soit chez la tomate ou *A. thaliana*, le transporteur assimile uniquement la forme  $\text{Fe}^{2+}$  et, sans réduction, la vitesse d'absorption du  $\text{Fe}^{3+}$  est seulement de 10 % (Eide et al., 1996).

Il est intéressant de noter que le riz possède des séquences similaires à *IRT1*; *OsIRT1* et *OsIRT2* (Eide et al., 1996). *OsIRT1* est un transporteur de Fe fonctionnel chez le riz (Lee & An, 2009). Le riz est une plante dite à stratégie 2, mais qui a la possibilité d'internaliser directement le Fe sous forme ferreuse (Ishimaru et al., 2006). En conditions submergées, ceci peut être avantageux puisque l'oxydation du Fe est moindre qu'en conditions aérobiques.

### 1.3.2 Stratégie 2

#### Deux étapes : complexation du Fe par les phytosidérophores et internalisation

La stratégie 2 se fait en deux étapes, soit l'extrusion d'agents chélateurs (phytosidérophores), suivie par l'internalisation du complexe Fe-phytosidérophore (Schmidt, 2003). Les plantes à stratégie 2 ont toutes la possibilité de synthétiser l'acide déoxymuginéique (ADM) qui est un chélateur de Fe (von Wirén et al., 1999). Les chélateurs relâchés peuvent non seulement lier le Fe, mais également d'autres métaux, tels le Zn, le Ni et le Cu (Schaaf et al., 2004).

Chez le maïs, le gène *YS1* code pour un transporteur capable d'internaliser le Fe si celui-ci est complexé à l'ADM (Curie et al., 2001). En isolant le gène et en l'introduisant chez le mutant *fet3fet4* de la levure (connu pour ne pas pouvoir assimiler le Fe), il pouvait promouvoir le transport du Fe, mais uniquement si le Fe était complexé à l'ADM (Curie et al., 2001). Le transporteur YS1 (*Yellow-stripe*) est une protéine riche en glutamate portant le motif REKELELELER qui est important pour le transport de Fe chez d'autres organismes (Severance et al., 2004, Große et al., 2006). Ce type de domaine riche en glutamate a déjà été

trouvé chez un transporteur membranaire de levure de haute affinité pour le Fe (Stearman et al., 1996). Les transcrits de *YSI* augmentent en carence de Fe, dans les racines et également dans les feuilles (Curie et al., 2001).

L'assimilation du Fe complexé à l'ADM augmente à des pH très acides (Schaaf et al., 2004). Avec le découpleur de protons CCCP, l'assimilation diminuait considérablement chez le maïs (Schaaf et al., 2004). Le transporteur co-transporte le complexe avec au moins 2 protons ce qui faciliterait l'entrée du complexe (Schaaf et al., 2004).

Le transporteur peut également lier la nicotianamine (NA), puisque celle-ci a une structure très semblable à l'ADM (von Wirén et al., 1999). Dans la plante, la nicotianamine serait impliquée dans le transport de métaux à longue distance. Elle peut être complexée à différents métaux et peut lier le  $\text{Fe}^{3+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  (von Wirén et al., 1999, Pich et al., 2001). Pour étudier l'utilité de la NA, Pich et Scholz (1996) ont utilisé le mutant de tomate *chloronerva* qui est incapable de synthétiser la nicotianamine synthase (Ling et al., 1999). Ils ont pu observer que plusieurs métaux, principalement le Fe et le Cu s'accumulaient dans les racines du mutant. Les quantités de Fe et de Cu racinaires diminuaient après ajout de NA exogène. Les quantités de Fe dans le xylème diminuaient également chez le mutant, indiquant que la NA joue un rôle dans le transport de Fe à travers le xylème. La NA peut également se complexer au Fe et être stocké dans la vacuole et ainsi servir de réserve de Fe interne (Pich et al., 2001). *A. thaliana* a la possibilité de produire de la nicotianamine et contient également des séquences *YS-like* (Curie et al., 2001). Il serait donc possible qu'*A. thaliana* utilise le NA pour complexer le Fe et faciliter son déplacement à travers la plante via les transporteurs YSL (*Yellow-stripe Like*) (Schaaf et al., 2004).

## **1.4 Métabolisme énergétique en carence de Fe – Stratégie 1**

### **1.4.1 Croissance cellulaire et enzyme impliquées dans la fourniture de précurseurs d'ADN**

#### **Diminution de l'accumulation de biomasse en déficience de Fe**

Plusieurs études ont été effectuées sur la déficience en Fe chez les cellules végétales. L'un des signes facilement observable et quantifiable pour identifier les plantes ou les cellules stressées est la différence de densité cellulaire (nombre de cellules par unité de volume) pour les cultures cellulaires, ou la différence de taille entre certaines plantules après quelques jours de culture (Thoiron et al., 1997), i.e. une perte nette de biomasse (Msilini et al., 2009). Dans des cultures cellulaires, la croissance mesurée par l'augmentation de poids frais des cellules est plus élevée en présence de Fe qu'en absence de Fe (Pascal & Douce, 1993). Il est possible que la différence de poids frais entre les deux cultures soit due à un changement au niveau de la taille des cellules (le contenu cytoplasmique serait plus riche pour les cellules +Fe). Une autre possibilité est que le taux de division soit plus lent ou carrément bloqué en absence de Fe. Des résultats préliminaires obtenus par E. Auslender au laboratoire ont permis de montrer une différence de la biomasse pour des cellules carencées en Fe, en plus de différences de significatives dans certaines phases du cycle cellulaire. Dans ces résultats on s'aperçoit qu'il y a des différences significatives surtout à la fin du cycle de culture. En présence de Fe les cellules sont 5 fois plus nombreuses, pour les phases G1 et S (manuscrit en préparation). Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai également observé cette différence de biomasse entre les deux traitements. Et afin d'évaluer les liens possibles entre la baisse de rendement en poids frais, les différences observées dans le cycle cellulaire, et la capacité des cellules à synthétiser l'ADN, j'ai étudié quatre enzymes importantes impliquées dans le métabolisme carboné ou énergétique et engagées dans la fourniture de précurseurs pour la synthèse d'ADN; la NDPK, la RNR, la G6PDH et la 6-PGDH.

#### **Nucléoside diphosphate kinase (NDPK) et le réapprovisionnement des NTP**

La NDPK est une enzyme qui catalyse la formation de nucléoside diphosphate en nucléoside triphosphates (Morera et al., 1995). Elle est responsable de l'homéostasie de pool



des NTP et des dNTP dans la cellule (Prabu et al., 2012). De plus, elle est importante pour la transduction de certains signaux pour différentes cascades de signalisation (Otero, 2000, Dorion & Rivoal, 2015).

Plusieurs études protéomiques ont démontré que dans certaines conditions de stress, comme les niveaux de NDPK intracellulaire augmentaient. Par exemple, suite à l'exposition de certains stress tels qu'une salinité élevée (Kav et al., 2004), la sécheresse (Hajheidari et al., 2005) et l'exposition à des agents oxydants (Sweetlove et al., 2002). Non seulement la NDPK est impliqué à la réponse au stress, mais également à des processus communs à la cellule tels que la réponse à certaines hormones (Novikova et al., 1999) et la signalisation des rayons UV-B (Zimmermann et al., 1999). Il a également été démontré que l'expression de la NDPK1 (isoforme prédominante dans les tissus végétaux) est corrélée à la croissance des cellules en culture et dans les méristèmes végétaux (Dorion et al., 2006) et pourrait donc jouer le même rôle dans la croissance cellulaire des cultures de *S. tuberosum*.

### **Ribonucléotide réductase (RNR) et réapprovisionnement de dNTP**

La RNR est une enzyme clé dans la synthèse *de novo* des désoxyribonucléotides triphosphates ce qui faisant d'elle une enzyme essentielle à la réparation et à la synthèse d'ADN (Thelander & Reichard, 1979, Pham et al., 2002). La RNR est un complexe protéique composé d'une grande sous-unité (R1) et de deux petites sous-unités (R2). Ces dernières ont chacune deux atomes de Fe qui sont essentiels à son activité catalytique pour la formation des désoxyribonucléotides (Perlstein et al., 2005). En carence de Fe, l'activité et la synthèse de cette enzyme sont probablement affectées (Wang & Liu, 2006). Chez certains mammifères, lorsqu'il y a une diminution de l'activité de la RNR, on peut observer une diminution des pools des désoxyribonucléotides qui entraîne une diminution de la synthèse d'ADN et conséquemment, une diminution de la division cellulaire (Cavanaugh et al., 1985, Furukawa et al., 1992). Un effet semblable peut être observé chez *A. thaliana* portant une mutation dans le gène codant pour la petite sous-unité R2 de la RNR (Wang & Liu, 2006). Il y a une diminution dans les pools de désoxyribonucléotides triphosphates, un développement aberrant de certaines parties de la plante (telles les feuilles et les carpelles) et le cycle cellulaire est interrompu. En carence en Fe, cette enzyme a été étudiée principalement chez la levure, mais on connaît peu

les mécanismes exacts qui régulent son activité (Sanvisens et al., 2011). Chez la levure son rôle est si important qu'en déficience de Fe, il y a répression d'autres processus utilisant le Fe afin de favoriser l'activité de la RNR (Sanvisens et al., 2011).

### **Les deux premières enzymes de la voie de pentoses phosphates (VPP) et le réapprovisionnement en squelettes carbonés pour la synthèse de NTPs**

Les deux autres enzymes sont les deux premières enzymes de la VPP. La G6PDH (Glucose 6-phosphate déshydrogénase) et la 6-PGDH (6-phosphogluconate déshydrogénase) sont particulièrement importantes pour la synthèse de précurseurs d'ADN car celles-ci peuvent transformer le G6P (produit par la glycolyse) qui servira à la formation de plusieurs molécules organiques qui servent à d'autres voies de biosynthèse. Parmi ces molécules on retrouve le R5P qui est utilisé pour la synthèse d'acides nucléiques (Ayar-Kayali, 2010). Nous nous intéressons donc à ces deux enzymes car elles mènent à la production de squelettes carbonés utilisés pour la synthèse de précurseurs d'ADN (Hove-Jensen, 1988). De plus ce sont les enzymes clés de la VPP et également les plus régulées de cette voie métabolique (Chen et al., 2003). L'importance de ces enzymes est discutée plus loin dans la section intitulée « Voie des pentoses phosphate ».

## **1.4.2 Le métabolisme carboné et son remaniement en déficience de Fe**

### **Métabolisme carboné - Diminution des activités des complexes I et II de la chaîne respiratoire**

Plusieurs ions métalliques servent de cofacteur à des réactions d'oxydo-réduction puisqu'ils peuvent être sous plusieurs états ioniques, le Fe en fait partie et il est particulièrement important pour le fonctionnement de la mitochondrie (Nouet et al., 2011). Dans des mitochondries isolées d'*A. thaliana*, le ratio molaire des ions métalliques Fe:Zn:Cu:Mn est respectivement de 26:8:6:1. Bien que le Fe soit présent en grande quantité, il ne faut pas exclure la possibilité qu'une partie de ce Fe soit complexé sous forme de Ferritine, une protéine d'emmagasiner de Fe (Laulhere & Briat, 1993, Ravet et al., 2009).

Dans les mitochondries, plus précisément, dans la chaîne de transport des électrons plusieurs protéines contiennent soit des groupements hème ou des clusters Fe-S (Nouet et al.,

2011). Les processus qui permettent le fonctionnement de la stratégie I décrite ci-dessus nécessitent de l'énergie. Celle-ci provient de la respiration qui se fait dans les mitochondries sous forme de pouvoir réducteur et d'ATP. En carence de Fe, il y a une augmentation du nombre de mitochondries, ce qui est corrélé avec l'augmentation de la vitesse de respiration des cellules en déficience mesurée en suivant la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> (Pascal & Douce, 1993, Vigani et al., 2009). Chez les racines de concombre, la consommation d'oxygène augmente d'environ 55% en carence de Fe (Vigani et al., 2009). En utilisant des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (SHAM inhibiteur de l'AOX et KCN inhibiteur du cytochrome c oxidase), il a été montré qu'une proportion non négligeable de la consommation d'oxygène était résistante aux inhibiteurs de la respiration. Ceci pourrait indiquer que l'oxygène pourrait être utilisé par la FC-R (Vigani et al., 2009).

Une situation inverse a été observée dans les cellules de sycomore (*Acer pseudoplatanus* L.). La respiration diminue dans les cellules en division pendant la déficience en Fe (Pascal & Douce, 1993). La quasi-totalité des transporteurs de la chaîne respiratoire contient des atomes de Fe, il est alors normal qu'en carence de Fe, le flux à travers la chaîne de transport des électrons soit affecté. Chez le concombre, ce sont les complexes I et II qui sont les plus touchés, ayant 20 et 10 atomes de Fe respectivement (Vigani et al., 2009). En carence de Fe ces derniers sont les complexes ayant la plus petite activité (5 et 13%, en les comparant avec leur activité respective en suffisance de Fe). L'activité du complexe II diminuait d'environ 50% en déficience de Fe chez les cellules de sycomore (Pascal & Douce, 1993). Dans les racines de *Medicago truncatula* une analyse protéomique a révélé que les niveaux de certaines enzymes du métabolisme diminuaient en déficience de Fe, dont celui du complexe I de la chaîne respiratoire (Rodríguez-Celma et al., 2011). Même si les niveaux de Fe sont bas la mitochondrie peut continuer à produire de l'énergie car souvent en déficience de Fe, les NADPH déshydrogénases de la membrane mitochondriale sont activées et celles-ci permettent d'alimenter la chaîne de transporteur d'électrons sans utiliser les complexes I et II (Vigani & Zocchi, 2009, Vigani et al., 2009, Vigani & Zocchi, 2010). Ces NAD(P)H déshydrogénases alternatives sont présentes à la surface externe de la membrane interne de la mitochondrie et utilisent le pouvoir réducteur produit dans le cytoplasme en fournissant des électrons au pool des ubiquinones (Møller, 1997). D'un autre côté, Pascal et Douce (1993) ne

mesurent qu'une diminution dans le complexe II des mitochondries de sycomore en carence de Fe, or ces résultats sont à analyser avec prudence puisque ces auteurs n'ont pas mesuré les activités spécifiques pour l'ensemble des complexes.

Ainsi, dépendamment de l'espèce ou du matériel considéré, il se peut que l'on observe une augmentation de la respiration i.e. du métabolisme ou, à l'inverse, une diminution. Pour d'autres stress, on peut observer des réponses divergentes également. Par exemple, chez le potamot pectiné, en anoxie, on observe l'effet Pasteur qui a pour effet d'augmenter le métabolisme carboné (Summers et al., 2000). Celui-ci se caractérise par une augmentation du métabolisme, plus précisément du flux glycolytique afin de produire des grandes quantités d'ATP car celles produites par la fermentation sont bien trop faibles pour permettre la survie des cellules (Geigenberger, 2003) (Gibbs & Greenway, 2003). Alors que chez d'autres espèces on a l'effet contraire une dépression du métabolisme. En diminuant le métabolisme, la cellule maintient les niveaux d'énergie minimaux qui lui permettront de maintenir uniquement certaines fonctions essentielles à la survie (Greenway & Gibbs, 2003). Chez *S. tuberosum*, jusqu'à présent, il n'y avait pas eu d'étude visant à caractériser sa réponse à la déficience en Fe. On pouvait alors se demander si la réponse serait une diminution ou une augmentation de l'activité du métabolisme primaire. Des éléments de réponse à cette question seront donnés dans les prochaines sections de ce mémoire.

### **Voie des pentoses phosphates (VPP)**

La VPP utilise le glucose 6-phosphate (G6P) produit par la glycolyse pour former différentes molécules organiques et elle est une grande source de pouvoir réducteur dans la cellule sous forme de NADPH. Elle est importante pour la croissance cellulaire car elle peut fournir des squelettes carbonés pour la synthèse d'acides aminés aromatiques, via l'érythrose 4-phosphate (E4P), d'ADN et d'ARN, via le ribose-5-phosphate (R5P) (Ozcelik et al., 2004, Fukuoka & Enomoto, 2001, Hove-Jensen, 1988, Ayar-Kayali, 2010). De plus, ces processus de synthèse demandent du pouvoir réducteur sous forme de NADPH qui peut leur être fourni par les deux premières enzymes de la VPP (Thomas et al., 1991, Ayar-Kayali, 2010, Bruinenberg et al., 1983). La VPP est d'autant plus importante pour les tissus ou cellules non-photosynthétiques, comme le modèle de culture cellulaire de *S. tuberosum* utilisé au

laboratoire, car la VPP est la seule source de NADPH dans ces conditions (Nee et al., 2014, Wakao & Benning, 2005).

La G6PDH est l'enzyme dont l'action est limitante pour le flux dans la VPP (Nee et al., 2014) et aussi l'une des plus régulées (Ayar-Kayali, 2010). La G6PDH est régulée par certains métabolites comme le NADPH (Ruelland & Miginiac-Maslow, 1999), par les ratios NADPH/NADP<sup>+</sup> et le ribulose 5-phosphate (Lendzian & Bassham, 1975). Ainsi que par les échanges de groupes thiols-disulfures faits par le système redox ferrédoxine/thiorédoxine, une fois réduite la G6PDH est inactive (Wenderoth et al., 1997, Hauschild & von Schaewen, 2003, Balmer et al., 2006). Il a été également démontré que la G6PDH est régulée post-traductionnellement par phosphorylation (Dal Santo et al., 2012), bien que dans les tissus non-photosynthétiques la régulation de cette enzyme se fait uniquement par des métabolites (Nee et al., 2014).

En déficience de Fe l'activité de la G6PDH augmente chez le pois (Jelali et al., 2010) et chez la luzerne ciliée (M'sehli et al., 2009). L'augmentation de l'activité de ces enzymes pourrait être liée à leur induction en déficience de Fe. Les transcrits de la G6PDH et de la 6-PGDH augmentent en carence de Fe bien que ce ne soit pas de façon significative puisque l'augmentation est d'environ 25% comparativement au contrôle (Thimm et al., 2001). La seconde enzyme de la VPP, la 6-PGDH produit également du NADPH est son action est également limitante dans la voie (Chen et al., 2004), mais les mécanismes de régulation sont beaucoup moins bien caractérisés. Quant à son activité elle est bien corrélée à celle de la G6PDH dans la réponse à certains stress comme la limitation d'azote organique, certaines maladies et les hautes températures (Danson et al., 2000, Robinson, 2000, Fukuoka & Enomoto, 2001). En déficience de Fe, ces deux enzymes sont très importantes car elles fournissent du pouvoir réducteur à la FC-R (Sijmons et al., 1984b).

Des résultats préliminaires (essais enzymatiques) obtenus par le laboratoire avaient montré qu'en déficience de Fe, l'activité de la G6PDH est faible et stable tout au long du cycle de culture. En suffisance de Fe, l'activité est plus élevée particulièrement aux J3 et J9 du cycle de culture, où il y a des différences significatives entre les traitements (+/- Fe) (résultats non présentés). Une partie des études faites lors de ma maîtrise consistait à compléter ces résultats

en mesurant l'activité enzymatique de la 6-PGDH, ainsi que la quantité de ces deux enzymes par immunodétection.

### **Pool de nucléotides pyridines**

Il a été proposé que les nucléotides pyridines soient les donneurs d'électrons primaires pour la FC-R (deuxième étape de la Stratégie 1) (Buckhout et al., 1989, Schmidt & Schuck, 1996). Tout dépendamment de l'espèce, c'est le NADH ou le NADPH qui a ce rôle. Chez la fève, les racines en carence de Fe (après 8 jours de stress) traitées au ferricyanure, un accepteur d'électrons, avaient des quantités de  $\text{NADP}^+$  élevées. De ce fait, le ratio  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  doublait, alors que le ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ne changeait pas. Ceci a été interprété comme un indice que chez la fève, l'espèce qui donne ses électrons à la réductase est le NADPH (Sijmons et al., 1984b). Dans les cas où les pools de  $\text{NAD(P)H}$  augmentent, on mesure également l'induction d'enzymes produisant du  $\text{NAD(P)H}$  telles la G6PDH et la GAPDH (Sijmons & Bienfait, 1983, Thimm et al., 2001).

Pour pouvoir soutenir les réactions cataboliques, le pool de pyridines nucléotides doit être constamment ré-oxydé, et lors de certains stress le remaniement métabolique de la cellule peut changer les ratios des espèces oxydées/ réduites. Par exemple en déficience de Fe, dans les racines de concombre et de betterave on observe une diminution des ratios  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  (López-Millán et al., 2000b, López-Millán et al., 2009). En déficience de Fe, il y a activation des NADPH déshydrogénases de la membrane interne de la mitochondrie qui oxydent le NADPH (Vigani, 2012), sans compter la possibilité que d'autres enzymes consommant du NADPH soient stimulées également dans cette condition; la FC-R pourrait en faire partie (Sijmons et al., 1984b). Chez *Plantago lanceolata* on observe l'inverse, c'est-à-dire une augmentation des rapports  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ . Ceci a été lié à une baisse de fonctionnalité de la chaîne de transport d'électrons qui oxyde le NADPH produit dans le cytoplasme de la cellule (Sijmons et al., 1984b, Schmidt & Schuck, 1996).

### **Cycle de Krebs – Production d'acides organiques en déficience de Fe**

Le cycle de Krebs qui est alimenté par le catabolisme des sucres à travers la glycolyse et par la fixation anaplérotique de carbone par la PEPC est responsable de la formation de plusieurs acides organiques dans la cellule qui peuvent eux-mêmes servir de source de

squelettes carbonés (Sweetlove et al., 2010). De plus, le cycle de Krebs forme des métabolites tels que le NADH et du FADH<sub>2</sub> qui sont nécessaires à la production ATP par l'oxydation phosphorylante, par ce fait le flux du cycle de Krebs peut refléter la demande cellulaire en ATP (Sweetlove et al., 2010).

En réponse à certains stress, le flux du cycle de Krebs augmente afin de produire des acides organiques en grande quantité. Le rôle de ces acides organiques peut être varié. Par exemple, ils peuvent être exsudés par les racines de plantes afin de participer à la solubilisation du Pi qui peut former des complexes avec les cations présents dans le sol tel que le Fe, l'Al et le Ca (Hinsinger, 2001). Ils peuvent également libérer le Pi des composantes du sol par échange de ligand (Gerke et al., 2000, Jones, 1998). Les carboxylates peuvent aider à la réponse de métaux toxiques (Ma et al., 2001) et finalement ils peuvent servir aux interactions entre les plantes et les micro-organismes du sol (Rudrappa et al., 2008). Ils sont également importants pour maintenir un pH stable dans le cytoplasme (Martinoia et al., 2007, Davies, 1986, Rabotti et al., 1995, Krome et al., 2007). Le cycle de Krebs forme plusieurs acides organiques servant de squelettes carbonés pour la synthèse d'acides aminés. Par exemple, du 2-oxoglutarate qui intervient dans l'acquisition de l'azote par la cellule (Hodges, 2002). L'activité de la PEPC peut également influencer la synthèse de certains acides aminés. L'oxaloacétate (OAA) peut être transformé en aspartate pour ensuite former les acides aminés de cette famille (Rademacher et al., 2002)

Chez plusieurs espèces, les acides organiques tels le citrate et le malate augmentent de façon considérable au niveau des racines en déficience de Fe (Rabotti et al., 1995, López-Millán et al., 2000a, Landsberg, 1986). Leur extrusion dans le milieu extracellulaire est nécessaire à l'internalisation du Fe dans les cellules (Schmidt, 2003a, Abadía et al., 2002). Lorsque l'extrusion est couplée avec un co-transport de H<sup>+</sup>, il y a une acidification du pH dans le milieu environnant les racines (Msilini et al., 2009). Les acides organiques serviraient également au transport du Fe des racines vers les feuilles par le xylème (Stephan, 2002, Tiffin, 1966) en étant un chélateur de Fe (Durrett et al., 2007). Chez les plants de cacahuètes et de tomates, les quantités de citrate augmentaient considérablement dans le xylème lors du stress, mais pas dans les racines (de Vos et al., 1986, López-Millán et al., 2009). Une des explications possibles soutient que le citrate serait exporté sous forme complexée avec le Fe (chélat de Fe)

vers les organes aériens via le xylème (López-Millán et al., 2009). Une autre utilité de la formation de citrate et de malate en déficience en Fe est de rétablir le pH cytosolique après extrusion massive de protons par la ATPase à  $H^+$  (Landsberg, 1986). En déficience de Fe, l'extrusion de protons cause une baisse de pH dans le cytosol des cellules. La production de citrate et de malate servirait à contrôler le pH (mécanisme de pH-stat) (Rabotti et al., 1995), mais cette explication est acceptable pour certaines espèces seulement. Chez le poivron rouge, il y a une accumulation de citrate, mais le milieu n'est pas acidifié par les racines du plant en déficience de Fe. Ainsi, chez cette espèce, l'accumulation de citrate ne servirait pas à rétablir le pH après extrusion de protons par l'ATPase, mais aurait un autre rôle encore mal caractérisé (Landsberg, 1986). Dans les racines de tomate, en déficience de Fe, l'activité de plusieurs enzymes du cycle de Krebs responsables de la formation de ces acides organiques augmentent, telles la CS, l'ICDH, la fumarase et l'aconitase (López-Millán et al., 2009) ce qui maintiendrait le cycle de Krebs à un taux élevé et permettrait une augmentation de la synthèse d'acides organiques.

#### *La PEPC alimente le cycle de Krebs en déficience de Fe*

Il y a souvent une corrélation positive entre l'augmentation de l'activité de la PEPC et la tolérance à la déficience de Fe (Arias-Baldrich et al., 2015). En effet, en déficience de Fe, l'activité de la PEPC a tendance à augmenter dans les racines de plusieurs espèces à stratégie 1 (Landsberg, 1986, De Nisi & Zocchi, 2000, López-Millán et al., 2000a, Jiménez et al., 2011). Chez la plupart des espèces étudiées, l'augmentation de la production d'acides organiques est étroitement liée à une augmentation de l'activité de la PEPC (2 à 60 fois dépendant des études) qui assure la fixation de  $CO_2$  anaplérotique sur une molécule de phosphoénolpyruvate (PEP) pour former de l'OAA (Landsberg, 1986, De Nisi & Zocchi, 2000, Rabotti et al., 1995, López-Millán et al., 2000b, Msilini et al., 2009, Krome et al., 2007). L'OAA formé par la PEPC peut être converti en malate par la MDH cytosolique. Le malate peut alors entrer dans la mitochondrie via la navette malate-oxaloacétate. Dans la mitochondrie, il y aura production de citrate par la CS, enzyme participant au cycle de Krebs (López-Millán et al., 2000b). Cependant, il faut noter que l'ensemble de ces données a été recueilli *in vitro*. Les activités enzymatiques obtenues sont en fait l'activité catalytique maximale et peuvent ne pas refléter la situation authentique en conditions physiologiques (*in vivo*). Il est en effet bien connu que



l'activité des enzymes *in vivo* est limitée par de nombreux facteurs, tels la variation de pH, les modifications covalentes et la variation dans la concentration des substrats disponibles, les effecteurs allostériques pour n'en citer que quelques-uns (Plaxton & Podestá, 2006a, Plaxton, 1996). L'activité *in vivo* peut par contre être mesurée avec des techniques d'analyse de flux métabolique.

L'activité de la PEPC peut être régulée à différents niveaux (O'Leary et al., 2011). Il est bien établi que la PEPC peut être régulée par certains métabolites, tels le G6P et le malate (Izui et al., 2004). Le G6P stimule la PEPC (Krömer et al., 1996), tandis que le malate l'inhibe (Wedding et al., 1990). Il est également connu que cette enzyme est la cible de mécanismes de régulation post-traductionnelle, notamment par phosphorylation par des PEPC kinases (Jeanneau et al., 2002, Vidal & Chollet, 1997, O'Leary et al., 2011). La phosphorylation de la PEPC est connue pour augmenter l'activité de cette dernière, car elle diminue la sensibilité de l'enzyme pour les inhibiteurs allostériques, tel le malate, et augmente la sensibilité pour les activateurs allostériques comme le G6P (O'Leary et al., 2011). Il a été observé chez *A. thaliana*, en condition de déficience en Fe, que la PEPC est phosphorylée et l'hypothèse a été émise que ce mécanisme serait responsable de la stimulation de son activité (Lan et al., 2012). Chez le concombre, la PEPC est également phosphorylée en réponse à la déficience en Fe. De plus, en faisant l'immunodétection de la PEPC chez le concombre, De Nisi et Zocchi (2000) ont été capables d'identifier deux isoformes de PEPC dont une de celles-ci est plus synthétisée en carence de Fe. Ainsi, en carence de Fe, De Nisi et Zocchi ont proposé que la régulation de la PEPC a lieu au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Il est intéressant de noter que, chez le concombre, l'isoforme dont la synthèse est promue en déficience de Fe est plus sensible au G6P en déficience de Fe. L'activation par le G6P assurerait ainsi la continuation du flux glycolytique pour former du PEP et ainsi continuer les activités métaboliques telles que la fourniture d'OAA et de malate pour la respiration (De Nisi & Zocchi, 2000). En effet, l'augmentation de la PEPC est parfois accompagnée de l'augmentation des activités de la MDH et la CS indiquant l'importance de la fixation anaplérotique de CO<sub>2</sub> pour l'alimentation du cycle de Krebs par la PEPC en déficience de Fe (López-Millán et al., 2000b). D'autres enzymes du cycle de Krebs augmentent également leur activité en carence de Fe, telles la fumarase, l'ICDH, la SDH et l'aconitase (López-Millán et al., 2009, Thimm et al., 2001,

Rellán-Alvarez et al., 2010). Certaines de ces enzymes sont même induites dans les feuilles (López-Millán et al., 2001). Il est intéressant de noter que plusieurs enzymes du cycle de Krebs qui sont induites forment du pouvoir réducteur (López-Millán et al., 2009). Celui-ci pourrait être utilisé par la FC-R pour augmenter la vitesse de réduction du Fe dans la rhizosphère (Rabotti et al., 1995). Chez d'autres espèces, il est possible de voir une diminution de l'activité de l'aconitase, ce qui causerait l'accumulation du citrate dans les cellules, soit des feuilles, soit des racines (de Vos et al., 1986, Pascal & Douce, 1993). L'aconitase est une enzyme qui contient des groupes Fe-S, ce qui peut expliquer pourquoi chez certaines espèces de plantes, son activité est altérée en déficience de Fe.

Le rôle de la PEPC est important en déficience en Fe, car non seulement elle alimente le cycle de Krebs, pour assurer une quantité d'acides organiques optimale à la réponse au stress, mais aussi elle maintient un métabolisme carboné élevé. En déficience de Fe, plusieurs observations suggèrent que les cellules végétales ont un métabolisme carboné élevé (production de métabolites énergétiques nécessaires à la stratégie). Étant donné que la régulation de la glycolyse est de type '*bottom-up*' c'est-à-dire que la régulation se fait par les métabolites formés à la fin de la glycolyse (Givan, 1999), l'utilisation du PEP par la PEPC contribue à assurer un flux continu à travers la glycolyse (Vigani, 2012), car cela lève l'inhibition allostérique du PEP sur la formation du fructose 1,6 bisP (O'Leary et al., 2011).

## **1.5 Présentation du projet de recherche**

### **1.5.1 Problématique**

La carence en Fe est un problème qui affecte l'ensemble des organismes vivants et pas seulement les plantes. Dans la population humaine, le manque de Fe est l'une des carences en micronutriments les plus importantes. La consommation de produits végétaux est une source majeure de Fe dans de très nombreux pays, surtout lorsque la viande n'est pas ou peu utilisée pour des raisons économiques ou culturelles. Or, une grande partie des terres agricoles ont peu de Fe disponible pour les plantes, celles-ci manquent donc de Fe et ceux qui consomment ces récoltes peuvent développer une carence en Fe. Les plantes affectées par la déficience en Fe mettent toute leur énergie à établir les stratégies pour s'approvisionner en Fe.

### 1.5.2 Objectifs, résultats préliminaires et hypothèses

La stratégie d'acquisition de Fe par l'ensemble de dicotylédones se fait en trois étapes, les deux premières requièrent de l'ATP et du pouvoir réducteur qui sont formés par le métabolisme énergétique (respiration, VPP et cycle de Krebs). Plusieurs études et des résultats préalables obtenus au laboratoire démontraient des modifications dans plusieurs aspects du métabolisme carboné, suite à une déficience en Fe, soit des changements dans la structure des mitochondries, une baisse de la capacité respiratoire et des changements significatifs dans l'activité de la PEPC. Pour compléter ces données, pour comprendre les changements se déroulant dans les cellules et comment ceux-ci peuvent affecter la survie en carence, le premier objectif de ma maîtrise a été de mesurer le flux glycolytique et le flux anaplérotique de C à travers la PEPC.

L'étude de la PEPC est particulièrement importante, car elle alimente le cycle de Krebs et participe à la formation d'acides organiques qui peuvent éventuellement avoir des rôles tels la chélation et le transport de Fe dans la cellule. Les deux acides qui sont principalement connus pour être utilisés à ces fins par la cellule sont le malate et le citrate. Ces acides sont formés par le cycle de Krebs. Pour cette raison, plusieurs auteurs mesurent l'activité de la PEPC en conditions de déficience de Fe (Andaluz et al., 2002). Cette enzyme peut former de l'OAA, à partir du PEP et du bicarbonate, l'OAA peut alors entrer dans le cycle de Krebs ou être transformé en malate par la MDH. Le malate peut lui aussi entrer dans le cycle de Krebs (O'Leary et al., 2011). De plus, le cycle de Krebs forme également du pouvoir réducteur sous forme de NADH, qui lui, est important pour la deuxième étape de la stratégie.

Pour étudier le comportement de la PEPC en déficience de Fe, dans les cellules de *S. tuberosum*, nous avons analysé l'expression relative de la PEPC par immunodétection ainsi que la mesure du flux à travers la PEPC à l'aide de marquages au bicarbonate marqué au  $^{14}\text{C}$ , suivi d'une analyse de la radioactivité soluble à l'acide dans les cellules. Pour cela, j'ai dû mettre au point la technique de marquage. La mesure du flux anaplérotique de la PEPC est une manière de mesurer l'activité de la PEPC *in vivo*. Durant le marquage, le carbone radioactif est intégré dans les intermédiaires du cycle de Krebs et il est possible de mesurer la radioactivité

présente sous forme d'acides organiques en traitant les cellules marquées à l'acide. Connaissant la radioactivité spécifique du traceur, on peut quantifier le flux de carbone qui a été incorporé dans le cycle de Krebs.

D'autres activités enzymatiques liées au métabolisme carboné, plus précisément à la voie des pentoses phosphates, ont été étudiées. La production de pouvoir réducteur lors de la carence pourrait se faire par l'intermédiaire de cette voie métabolique qui produit du NADPH par le biais des deux premières enzymes de la voie des pentoses phosphates, la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH). L'activité de la G6PDH a été préalablement mesurée par le laboratoire, ces études ont été complétées au cours de ma maîtrise, en quantifiant les niveaux protéiques de la G6PDH par immunodétection. En utilisant la même méthode, on a mesuré également l'expression relative de la 6-PGDH, en plus de son activité en utilisant des essais spectrophométriques.

Le dernier de mes objectifs touchant le métabolisme carboné a été de faire la mesure des pyridines nucléotides ( $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ ), qui constituent la source de pouvoir réducteur nécessaire à la deuxième étape de la stratégie. Ces mesures ont été faites par des essais de spectrophotométrie.

Des études concernant la progression des cellules à travers le cycle cellulaire en présence et en absence de Fe avaient précédemment été faites au laboratoire par E. Auslender. Ces travaux ont montré que la carence en Fe inhibe la progression à travers le cycle et induit l'endoreduplication (Figure annexe 1). Au niveau du cycle, une diminution de la quantité de cellules en phase S du cycle cellulaire pouvait notamment être observée en déficience de Fe. La phase S est la phase de réplication de l'ADN pour créer deux copies du matériel génétique (Alberts et al., 2002). Ces observations sont très intéressantes car souvent la masse cellulaire est corrélée à la synthèse d'ADN, ainsi qu'à la vitesse de division (Herrick & Sclavi, 2007). Une diminution de la synthèse d'ADN pourrait être liée à une diminution des pools des dNTPs. Les cellules n'ayant plus accès à des précurseurs de synthèse d'ADN sont incapables de poursuivre le cycle normal de division cellulaire (Cavanaugh et al., 1985) ce qui pourrait expliquer la diminution de poids frais observée en déficience de Fe. Parmi les facteurs à l'origine de ces résultats, nous avons examiné l'hypothèse que les différences de croissance observées en carence de Fe pouvaient être liées à une diminution de l'expression de certains

enzymes impliqués dans la fourniture de précurseurs pour la synthèse de l'ADN. C'est pourquoi je me suis intéressée à l'étude de certaines enzymes responsables de la fourniture de précurseurs pour la synthèse d'acides nucléiques, la G6PGDH, la 6PGDH, la NDPK et la RNR. Cette dernière diminue fortement en carence de Fe chez d'autres espèces souvent accompagnées d'une diminution des pools de NTP (Stubbe & van der Donk, 1995)

L'ensemble du travail présenté dans ce mémoire visait à mieux comprendre les modifications intervenant dans le métabolisme énergétique des cellules carencées en Fe. À terme, ces données nous permettront de mieux comprendre quelles adaptations métaboliques ont lieu dans les cellules carencées en Fe. À plus long terme, ces données pourraient être utilisées afin d'améliorer la croissance et le contenu en Fe de certaines espèces cultivées sur des sols à faible biodisponibilité en Fe.

### **1.5.3 Matériel biologique**

Pour étudier les réponses du métabolisme énergétique, il y a plusieurs avantages à travailler avec des cultures cellulaires. D'abord, dans un tel système, toutes les cellules sont en contact direct avec le milieu de culture. Donc toutes les cellules peuvent répondre de la même façon puisqu'elles sont toutes exposées aux mêmes conditions. De plus, les cellules en culture sont indifférenciées. De ce fait, la réponse de la culture n'est pas dépendante de leur état de différenciation, ce qui n'est pas le cas pour plusieurs autres systèmes utilisés, tels des tissus ou des plantes entières. Par exemple, dans les racines, il y a uniquement certains types de cellules dont la réponse en carence de Fe est fortement distincte: les cellules de transfert. Dans ce cas ou d'autres cas semblables, si les cellules qui répondent aux stress sont peu nombreuses par rapport à la masse du tissu, la possibilité de ne pas détecter une différence est élevée. En effet, lors du broyage du tissu, le contenu cellulaire de l'ensemble des cellules est confondu, la réponse cellulaire sera masquée par l'absence de réponse dans les autres cellules du tissu.

Le choix de mon matériel biologique s'est fait en conséquence de ces deux raisons. En ayant la certitude que toutes les cellules sont en contact direct avec le milieu et que la réponse est homogène, j'ai pu étudier aisément la réponse du métabolisme énergétique chez *S. tuberosum*. J'ai donc travaillé avec des cultures cellulaires de *S. tuberosum*. Ces cultures sont utilisées au laboratoire depuis de nombreuses années (Dorion & Rivoal, 2003). Pour la plupart

des expériences, j'ai inoculé les cellules dans un milieu de culture en présence (10  $\mu$ M) ou absence de Fe et j'ai récolté les cellules après 0, 3, 6, 9 et 12 jours de traitement.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1 Matériel biologique, cultures cellulaires de *S. tuberosum***

Avant d'effectuer une sous-culture il faut s'assurer de bien nettoyer toute la vaisselle utilisée de toute trace de Fe en la rinçant au moins trois fois à l'eau distillée. La vaisselle est entreposée dans des étagères, durant la période où elle est entreposée, elle peut accumuler des particules présentes dans l'air ambiant, dont du Fe. Si la vaisselle n'est pas rincée comme il faut, cette contamination suffit pour que les cellules ne soient plus carencées. Les cultures cellulaires de *S. tuberosum* sont sous-cultivées dans des nouveaux milieux à chaque 14 jours (durée d'un cycle). Les cellules sont sous-cultivées dans du milieu MS contenant du 2,4-D, 3% (p/v) de saccharose et 0  $\mu$ M Fe (cultures -Fe) ou 10  $\mu$ M Fe (cultures +Fe). Pour effectuer une sous-culture, le contenu de 5 erlenmeyers (+Fe) ayant des cellules âgées de 14 jours est mis en commun dans un cylindre gradué de 250 mL. On laisse décanter 20 minutes, après cette attente on resuspend avec approximativement 200 ml de milieu -Fe. Les cellules seront lavées de cette façon trois fois avec du milieu -Fe afin de se débarrasser du Fe résiduel provenant du milieu de culture précédent avant d'inoculer les nouveaux milieux. Afin d'assurer la reproductibilité des conditions de culture, il est important de toujours respecter le rapport entre le volume occupé par les cellules versus le volume total. Dans les expériences présentées ici, le rapport est de 80:280 (volume occupé par les cellules:volume total). Après les lavages, on inocule les nouveaux milieux avec 10 mL d'inoculum (équivalent à 0,9 g de poids frais). Les erlenmeyers sont maintenus à température pièce (22°C) sur des agitateurs rotatifs (145 rpm). Les cellules sont ensuite récoltées aux jours 0, 3, 6, 9 et 12 par filtration, pesées, congelées à l'azote liquide et gardées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### **2.2 Extraction des protéines et essais enzymatiques**

Toutes les étapes suivantes se font sur glace, sauf si mentionné autrement. Les échantillons de cellules ayant été conservé à -80°C sont transférés dans un tube conique de 15 mL avec le tampon d'extraction (30 mM HEPES-KOH pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycérol, 5% (w/v) PVPP, 0,1% (v/v) Triton X-100, 5 mM  $\epsilon$ -CA, 1

mg/L leupeptin, 1 mM benzamidine, 5 mM DTT, 1 mM PMSF ) respectant le ratio de 2 mL de tampon pour 1 g de cellules. Le tout est homogénéisé à l'aide d'un polytron (Brinkmann Instruments, Mississauga, ON, Canada) trois fois 15 secondes à puissance maximale. L'homogénat obtenu est reparti dans des tubes de 1,5 mL. On centrifuge ces tubes 15 minutes à 13200 rpm et on récupère le surnageant. Une partie du surnageant sert aux différents essais enzymatiques effectués immédiatement et une autre partie est dénaturée à 95°C dans le tampon SDS (10%) pour l'analyse des protéines solubles par immunodétection. Ces parties aliquotes sont conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Une unité d'activité enzymatique (U) équivaut à l'apparition du produit de la réaction à la vitesse de 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . La mesure d'activité enzymatique se fait directement ou à l'aide de réaction avec des enzymes coupleurs. La détection est basée sur la formation ou la consommation de NAD(P)H. La variation de NAD(P)H est observée à 340 nm à 30°C pendant 5 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaques VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale CA) préalablement calibré. La quantité de protéines de chaque échantillon est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaques VERSAmax en utilisant la méthode de Bradford (Bradford, 1976) et la BSA comme standard. L'activité spécifique de chaque enzyme est exprimée en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine.

### **2.2.1 6-PGDH**

L'essai pour mesurer l'activité de la 6-PGDH se fait selon la méthode établie par Simcox et Dennis (1978). Pour la lecture au spectrophotomètre on utilise 10  $\mu\text{L}$  du surnageant et 190  $\mu\text{L}$  du tampon d'essai contenant (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.25 mM 6-phosphogluconate et 0.25 mM NADP). Les réactions contrôles se font sans le 6-phosphogluconate. La mesure de l'activité se base sur la production de NADPH.

### **2.2.2 NDPK**

L'essai pour la NDPK se fait avec des enzymes coupleurs (PK et LDH) comme décrit précédemment (Dorion & Rivoal, 2003). Pour la lecture au spectrophotomètre, les puits de la plaque sont chargés avec 10  $\mu\text{L}$  du surnageant dilué cent fois (avec de l'eau) et 190  $\mu\text{L}$  de tampon d'essai contenant (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% (v/v) glycérol, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 75



mM KCl, 1 mM TDP, 3 mM ATP, 0.2 mM NADH, 1 mM PEP, 0.2 unités de PK et 1 unité de LDH, dans un volume de 200  $\mu$ L. Les réactions contrôles se font sans ATP. La mesure de l'activité se base sur la consommation de NADH par la LDH.

## **2.3 Électrophorèse de protéines en conditions dénaturantes et immunodétection**

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (1970). Les extraits dénaturés sont chargés (12  $\mu$ g de protéines par piste) sur des gels d'acrylamide à 10% (m/v) (pour l'analyse de la PEPC), 12% (m/v) (pour l'analyse de la 6-PGDH et la G6PDH) et 15% (m/v) (pour l'analyse de la RNR et la NDPK). La migration des protéines se fait durant 90 minutes à 100 V et à température ambiante. Le transfert de protéines se fait sur une membrane de nitrocellulose pendant 60 min à un voltage constant de 100 V en présence d'un bloc de glace pour refroidir le tampon de transfert. On vérifie l'efficacité du transfert en colorant la membrane au rouge ponceau comme décrit par Rivoal et al. (2001). Les membranes sont bloquées pendant une heure avec un tampon TBST [500 mM tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% tween-20 (v/v), 0,02% NaNO<sub>3</sub> (m/v)] contenant du lait en poudre (5% m/v). Les membranes sont ensuite rincées trois fois 10 minutes avec du tampon TBST. Suite aux lavages, on incube les membranes avec les anticorps pour les protéines ciblées. Dans le cadre de ma maîtrise, sept anticorps sont utilisés, correspondant à la PEPC, la 6-PGDH, la G6PDH, la RNR (un don de Avital Yahalom, Université de Tel Aviv) et la NDPK. On procède à un second cycle de rinçage (avec du tampon TBST, trois fois dix minutes). Une fois rincées, on incube les membranes avec une dilution (1/10 000) de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Promega, Nepean, ON, Canada) pendant une heure. Un dernier cycle de rinçage se fait avant d'incuber les membranes dans une solution contenant du BCIP et NBT pour visualiser l'activité de la phosphatase. Les temps de révélation varient entre une et trois minutes dépendamment des anticorps utilisés. La réaction colorée est arrêtée en lavant la membrane avec de l'eau distillée.

## 2.4 Extraction et mesure du pool de pyridines nucléotides

### 2.4.1 Formes réduites

Toutes les étapes se font sur glace, sauf si mentionné autrement. Les échantillons de cellules ayant été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  sont transférés dans des mortiers préalablement refroidis à l'azote liquide afin d'être réduits en poudre. On dépose 100 mg de cette poudre dans un tube de 1,5 mL et on lui ajoute 1 mL d'une solution de NaOH 0,2 N. L'ensemble des tubes sont centrifugés à 16 000 g pendant 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . L'ensemble du surnageant est récupéré dans des tubes de 1,5 mL et le volume de celui-ci est noté. On transfère 200  $\mu\text{L}$  du surnageant dans un tube à capuchon à vis et on dépose le tube dans l'eau bouillante pendant une minute après quoi on dépose les tubes dans un bain d'eau glacée pour les refroidir. On neutralise le contenu des tubes en ajoutant une solution de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M pH 5,6 (20  $\mu\text{L}$ ) et une solution de HCl 0,2N (approximativement 130  $\mu\text{L}$ ) pour obtenir un pH entre 7 et 8, vérifié avec un papier indicateur de pH. Cette solution est distribuée sur une microplaque à 96 puits à raison de 30  $\mu\text{L}$  par puit pour le NADH et 10  $\mu\text{L}$  par puit pour le NADPH. On distribue également différentes concentrations connues de NADH et NADPH qui serviront à faire une courbe standard. Les différentes quantités utilisées pour le standard sont 0, 5, 10, 20, 30 et 40 pmol par puit. Pour la lecture du NADPH, dans chaque puit on ajoute 160  $\mu\text{L}$  du mélange réactionnel (0,1 M Hepes pH 7,5, 2 mM EDTA, 1,2 mM DCPIP, 20 mM PMS, G6PDH 100 U/mL). La dernière étape est l'ajout du substrat dans chaque puit, 10  $\mu\text{L}$  G6P 10 mM. La plaque est lue par le spectrophotomètre à microplaque VersaMax à 600 nm à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes en mode cinétique. Pour la lecture du NADH, on ajoute dans chaque puit 155  $\mu\text{L}$  du mix réactionnel (0,1 M Hepes pH 7,5, 2 mM EDTA, 1,2 mM DCPIP, 20 mM PMS, ADH 2500 U/mL). La dernière étape est l'ajout du substrat (15  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 100%) dans chaque puit. Après agitation, on lit la plaque à 600 nm à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes en mode cinétique. La mesure de la quantité du métabolite se base sur la vitesse de développement de la coloration au fur et à mesure que les électrons sont donnés au DCPIP. La pente ( $\Delta\text{DO}/\Delta t$ ) ainsi obtenue est rapportée sur une courbe standard dans laquelle on a la quantité du métabolite en fonction des pentes obtenues.

## **2.4.2 Formes oxydées**

Pour les formes oxydées, les étapes restent les mêmes que pour les formes réduites à l'exception de deux manipulations. D'abord la neutralisation se fait avec une solution de NaOH 0,2N (approximativement 185  $\mu$ L). Finalement, la distribution sur la microplaque se fait à raison de 10  $\mu$ L par puit pour le NADP et 10  $\mu$ L par puit de la solution de NAD dilué 10X. Pour le NADP, le substrat et le mix réactionnel sont les mêmes que pour le NADPH. Pour le NAD, le substrat et le mix réactionnel sont les mêmes que pour le NADH.

## **2.5 Mesure du flux de dégradation du saccharose**

Cette expérience se fait avec du matériel frais pour chaque jour d'échantillonnage (J0, J3, J6, J9 et J12). La source radioactive utilisée a été du saccharose marqué au  $^{14}\text{C}$  (Moravek Biochemicals Inc., Brea, CA, numéro de catalogue MC266). Le carbone ainsi introduit dans la cellule va marquer radioactivement les intermédiaires et produits finaux du métabolisme. Ces produits marqués peuvent être extraits et quantifiés tel que décrit dans Rivoal et Hanson (1993a). Les différentes fractions générées par cette analyse sont :  $\text{CO}_2$ , fraction neutre, fraction cationique, fraction anionique (Fig. 1). D'autre part il a été déterminé que la production du  $^{14}\text{CO}_2$  depuis le  $^{14}\text{C}$  saccharose est maximale entre 120 et 300 min de marquage. Cette vitesse maximale de production du  $^{14}\text{CO}_2$  lors du marquage démontre que, entre 120 et 300 min, le matériel étudié est à l'équilibre métabolique et isotopique tel que défini par Salon et al. (1988). Cet état d'équilibre métabolique et isotopique est un critère nécessaire afin de pouvoir quantifier le flux dans ces expériences.

### **2.5.1 Détermination du poids frais par volume de culture et préparation des cellules pour le marquage**

Il est important de déterminer poids frais des cellules par mL de culture afin que le marquage se fasse dans des conditions similaires pour tous les échantillons. Pour les cultures ayant poussé en présence et en absence de Fe, le contenu de deux erlenmeyers (même jour et même traitement) est mis en commun pour un total de 140 mL de culture. Une partie aliquote

(10 mL) est prise pour être filtrée afin de peser les cellules pour connaître le poids frais par unité de volume pour les cultures +Fe et -Fe. Les cellules de chaque culture (+ Fe et – Fe) sont ensuite mises dans un contenant de 500 mL et centrifugée à 2 000 rpm durant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant est retiré et les cellules sont re-suspendues avec 50 mL de milieu de culture exempt de saccharose. On centrifuge une deuxième fois dans les mêmes conditions que précédemment et l'on retire le surnageant. On re-suspend les cellules avec un volume de milieu qui nous permettra d'avoir 200 mg de cellules dans 1,9 mL de culture en tenant compte du poids frais par unité de volume déterminé précédemment.

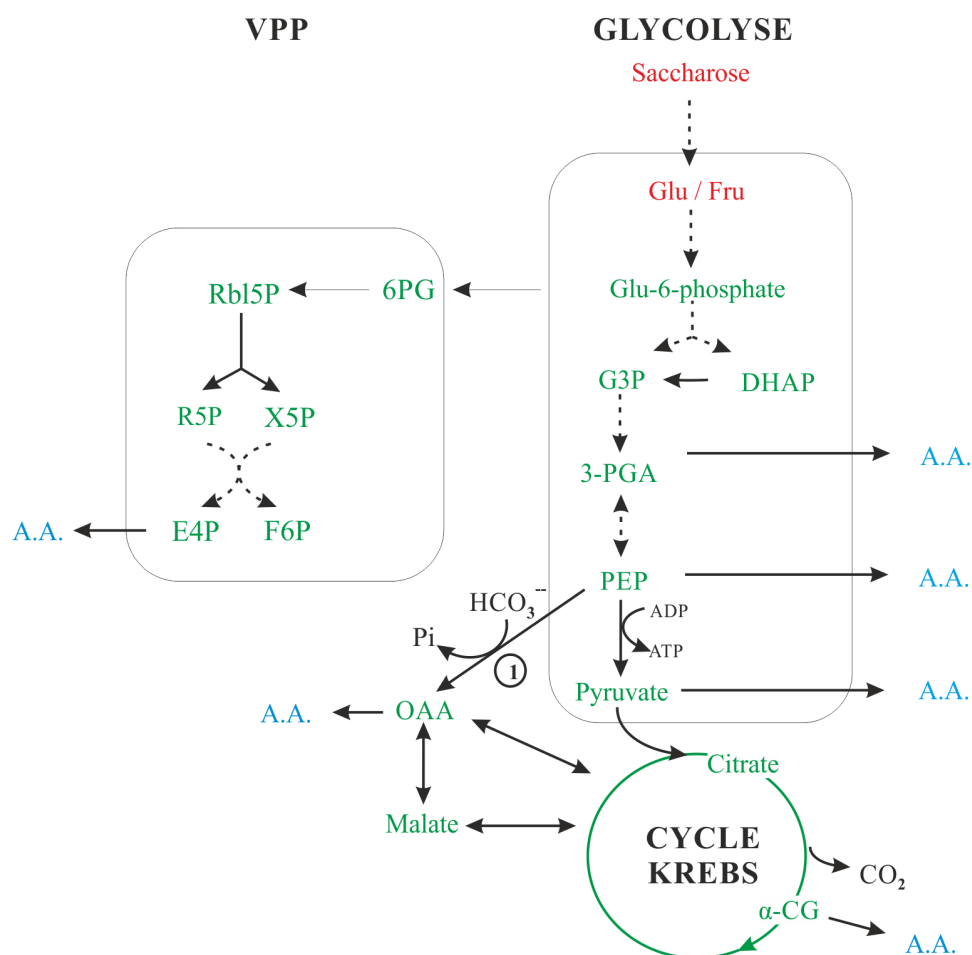


Figure 1. Distribution du carbone lors de la dégradation du saccharose radioactif. La répartition de la radioactivité dans les différentes fractions est identifiée à l'aide de différentes couleurs. Rouge : Sucres, portion neutre. Vert : Acides organiques, portion chargée négativement. Bleu : Acides aminés portion chargée positivement. 1 : PEPC.

### **2.5.2 Marquage des cellules au [U-<sup>14</sup>C] Saccharose et détermination du flux de C entre le saccharose et le CO<sub>2</sub>**

Dans un erlenmeyer Warburg, on dépose 100 µL de saccharose radioactif 4,386 µCi / mmol de Cet 1,9 mL de la suspension cellulaire +Fe ou -Fe préparée comme décrit ci-dessus. Dans le tube du centre, on dépose 500 µL d'une solution de KOH 1 M. L'ensemble des erlenmeyers Warburg est mis sur un agitateur rotatif à 150 rpm durant 120 minutes pour une première série d'erlenmeyers et 300 minutes pour une seconde série. Une fois le temps d'incubation en présence de traceur radioactif terminé, on récupère le KOH dans des tubes de 2 mL, on rince le tube central qui contenait le KOH avec 500 µL d'eau qu'on récupère également pour s'assurer de récupérer toute la radioactivité. On prend ensuite la culture cellulaire et on la fait passer dans une micro-colonne munie d'un filtre afin de séparer le milieu (qui passe à travers le filtre) et les cellules (qui sont retenues dans la colonne), ces éléments sont tous deux récupérés. Une partie aliquote du milieu (70 µL) et de la solution de KOH (10 µL) est mise dans un tube à scintillation avec 4,5 mL de cocktail à scintillation et analysé au compteur à scintillation Tri-Carb (Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) en utilisant le programme QUANTASMART. Pour récupérer les cellules on insère les colonnes dans des tubes coniques de 15 mL en position inversée et on centrifuge à 4000 g pendant une minute. Seulement les cellules ayant passé 5 heures sur les agitateurs rotatifs seront conservées dans une solution d'éthanol 80% (v/v) à -20 °C pour l'analyse de radioactivité dans les différentes fractions (acide, neutre, base). Cette étape lyse les cellules et libère les composés hydrosolubles.

En connaissant la radioactivité spécifique du saccharose (dpm/µmol de C) qui a été utilisé lors du marquage, et puisque le système est à l'équilibre métabolique et isotopique, il est possible de déterminer le flux de carbone entre le saccharose et le CO<sub>2</sub> (µmol de CO<sub>2</sub> apparaissant par h) en se basant sur la radioactivité comptée sous forme de CO<sub>2</sub> dans la fraction KOH. Les données sont ensuite normalisées selon le poids frais de cellules utilisées dans le marquage. Ainsi on obtiendra la quantité de saccharose catabolisé en CO<sub>2</sub> en µmol de C/h/g de poids frais.

## **2.6 Mesure de la répartition du flux de carbone dans les fractions acide, neutre et basique**

La séparation de chacune des fractions s'est fait selon la méthode mise au point par Rivoal et Hanson (1993b). Les cellules, conservées dans l'éthanol 80% (v/v), sont transférées dans des ballons de 250 mL pour évaporation à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif Büchi. On rince chacun des tubes qui contenaient les cellules avec 5 mL d'éthanol 80% et on transfère également ces 5 mL dans les ballons. On utilise un évaporateur rotatif Büchi muni d'un bain marie ajusté à 80 °C pour évaporer l'éthanol. Après évaporation de l'éthanol, les ballons contiennent les composés hydrosolubles séchés et les résidus de cellules. On lave chaque ballon avec 2,5 mL d'eau pour resolubiliser les composés hydrosolubles extraits et on fait passer cette solution à travers deux colonnes de chromatographie échangeuse d'ions arrangées en tandem, l'une acide (50WX8) et l'autre basique (AGI-X8). La solution qui sort de la seconde colonne contient la fraction neutre (molécules non chargées, principalement les sucres). Elle est récupérée dans un tube de 20 mL. On répète cette étape sept fois i.e. on lave chaque ballon avec 20 mL d'eau au total. La solution récupérée servira à l'analyse de la fraction neutre. On élue la colonne échangeuse d'anions avec 15 mL d'acide formique 8 M on récupère la solution qui en sort. Cette solution contient les acides organiques. On fait de même avec les colonnes échangeuse de cations en utilisant 15 mL d'une solution de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1M. La solution d'élution de cette colonne contient principalement les acides aminés. On prend des parties aliquotes de 150  $\mu\text{L}$  des solutions acides et basiques récupérées dans des tubes à scintillation avec 4,5 mL de cocktail à scintillation. On fait de même avec les solutions neutres récupérées, mais on prend une partie aliquote de 500  $\mu\text{L}$  au lieu de 150  $\mu\text{L}$ . La mesure de la radioactivité (dpm) est faite à l'aide d'un compteur à scintillation comme indiqué ci-dessus. Les comptages de radioactivité de toutes les fractions récupérées comptée permettent de s'assurer que la radioactivité de départ est bien récupérée à la fin du marquage. Dans les expériences présentées dans ce mémoire, la récupération de la radioactivité était en moyenne de 94,2%.

## 2.7 Mesure du flux anaplérotique de la PEPC

Cette expérience se fait avec du matériel frais pour chaque jour d'échantillonnage (J0, J3, J6, J9 et J12). La source radioactive qui a été utilisée est du bicarbonate marqué au  $^{14}\text{C}$  (Moravek Biochemicals Inc. Brea, CA, numéro de catalogue MC208). La PEPC forme de l'OAA et donc permet l'incorporation du carbone dans les intermédiaires du cycle de Krebs et dans certains acides aminés (Fig. 2). Ces composés sont stables en conditions acides.

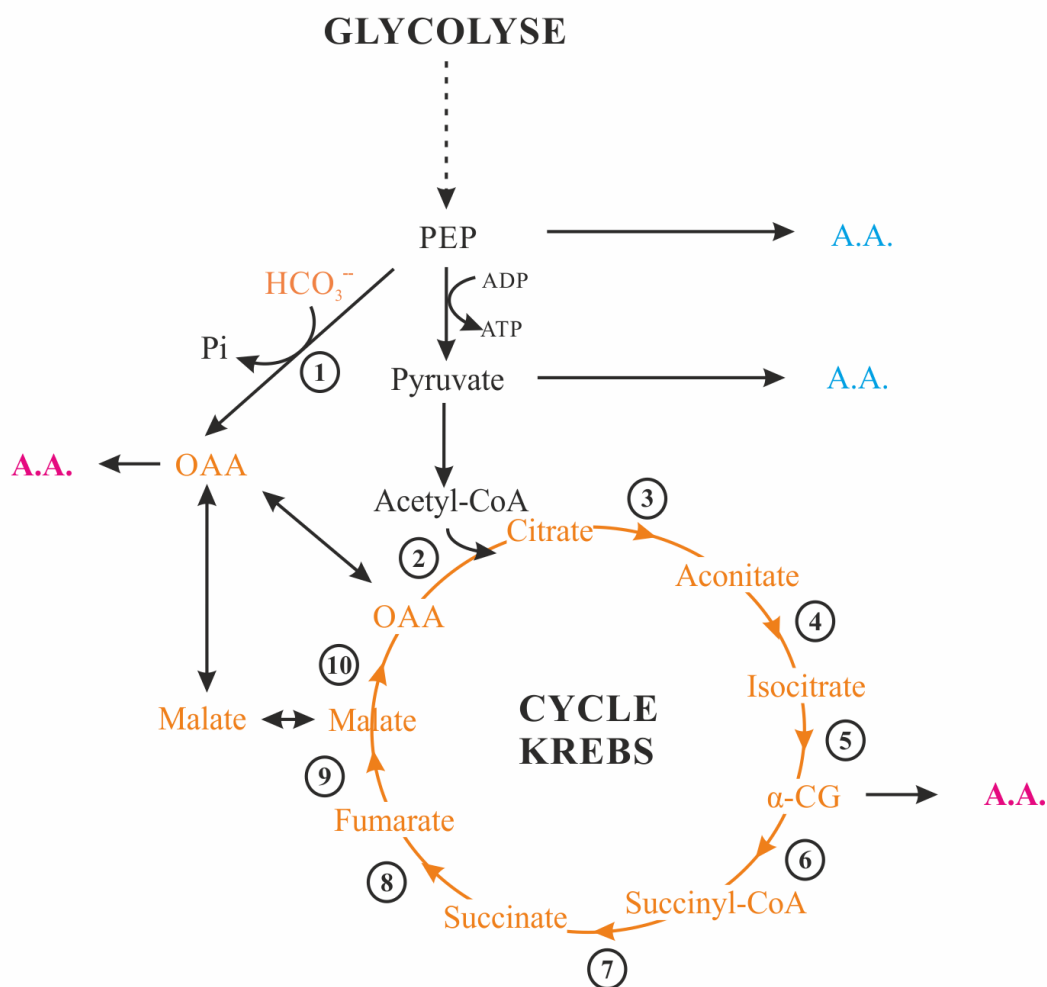


Figure 2. Cycle de Krebs. Bleu : acides aminés, orange : acides organiques marqués, rose : acides aminés marqués 1 : PEPC. 2 : citrate synthase, 3 : aconitase, 4 : aconitase, 5 : ICDH, 6 :  $\alpha$ -CGDH, 7 : Succinyl Co-A synthase, 8 : succinate deshydrogénase, 9 : fumarase, 10 : malate deshydrogénase

### **2.7.1 Détermination du poids frais par volume de culture**

Cette étape est nécessaire pour ajuster le ratio poids frais par mL de culture lors du marquage. Pour les cultures ayant poussé en présence et en absence de Fe, on combine 2 erlenmeyers ensemble pour un total de 140 mL de culture. On prend une partie aliquote qu'on filtre au vide et on pèse pour déterminer le poids frais pour 10 mL de culture.

### **2.7.2 Préparation des cellules pour le marquage**

On prend 50 mL de culture dans un contenant de 500 mL et l'on centrifuge à 2 000 rpm durant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant est retiré et les cellules sont re-suspendues avec 50 mL de milieu de culture tamponné avec du tampon HEPES 10 mM pH 7,3 afin d'éviter d'avoir un pH acide qui favoriserai la perte du bicarbonate en CO<sub>2</sub>. On centrifuge une deuxième fois dans les mêmes conditions que précédemment et on retire le surnageant. On resuspend les cellules avec un volume de milieu tamponné avec du HEPES qui nous permettra d'avoir 50 mg de cellules dans 4 mL de culture selon les résultats obtenus au point 2.7.1.

### **2.5.3 Marquage des cellules au <sup>14</sup>CHNaO<sub>3</sub>**

Dans un erlenmeyer Warburg de 25 mL, on dépose 120 µL de bicarbonate radioactif (solution 200 mM à 0,104 µCi/µmol) tamponné avec du HEPES 13,3 mM pH 7,3 et 3,88 mL de la suspension cellulaire préparée ci-dessus. On ferme les erlenmeyers avec des bouchons en caoutchouc qui peuvent être percés par une seringue. L'ensemble des erlenmeyers Warburg sont mis sur un agitateur rotatif et on laisse agiter à 150 rpm durant 10 minutes. Après ces 10 minutes on injecte avec une seringue à travers le bouchon 10 mL d'une solution d'EtOH 75% (v/v) acidifié avec HCl 0,5 N dans le milieu d'incubation avec le traceur radioactif. Cette solution stoppe le métabolisme, entraîne la transformation du bicarbonate non utilisé en CO<sub>2</sub> et extrait les composés hydrosolubles présents dans les cellules. On injecte également dans le tube central 2 mL d'une solution de KOH 1M. En un milieu acide, le bicarbonate non métabolisé évaporé sous forme de CO<sub>2</sub> pourra être précipité sous forme de bicarbonate de potassium en présence de KOH. De cette façon la radioactivité résiduelle dans la culture cellulaire est sous forme d'acides organiques formés par le cycle de Krebs alimenté en carbone



radioactif par la PEPC ou d'acides aminés générés à partir des acides organiques marqués au  $^{14}\text{C}$ . Pour s'assurer que le bicarbonate n'ayant pas été métabolisé par la PEPC soit entièrement dégagé en  $\text{CO}_2$ , on laisse incuber 3 heures. Dans des expériences préliminaires, ce temps a été démontré comme largement suffisant pour ne plus avoir de dégagement de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir du milieu de marquage. Après ce temps, on prend une partie aliquote de 1 mL de culture dans un tube à scintillation de 6,5 mL avec 4,5 mL de cocktail à scintillation et on fait la lecture au compteur à scintillation. Une partie aliquote de la solution de KOH est également comptée pour s'assurer que la radioactivité de départ est bien récupérée à la fin du marquage. Dans les expériences présentées dans ce mémoire, la récupération de la radioactivité était en moyenne de 94,7%.

### **3. Résultats et discussion**

#### **3.1 Effets de la carence en Fe sur l'accumulation de biomasse, croissance cellulaire et sur l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse d'ADN**

En prenant les mesures de poids frais, on peut s'apercevoir d'une différence significative entre les deux cultures. Les cellules +Fe ont un poids frais supérieur aux cellules -Fe (fig. 3a) à partir de trois jours de culture. On peut observer la même tendance, lorsque l'on fait la mesure de poids sec des cellules, les cellules cultivées dans des conditions suffisantes en Fe montrent un poids sec plus élevé que les cellules déficientes en Fe (fig. 3b). La déficience en Fe a donc un impact sur l'accumulation de masse des cellules. Les cellules en déficience de Fe accumulent moins de masse que celles en suffisance. Ces résultats viennent s'ajouter aux résultats obtenus précédemment par E. Auslender dans le laboratoire dans lesquels on peut observer une différence dans la quantité de cellules présentes dans certaines phases du cycle cellulaire, en particulier sur la phase S (fig. S1) du cycle mitotique. Ces données pourraient indiquer une diminution de la capacité pour la synthèse de l'ADN en condition de manque de Fe. Ces données peuvent également indiquer la présence d'un point de contrôle entre les phases G1/S. Chez d'autres organismes, tels la levure, la cellule doit atteindre une taille précise avant de poursuivre vers la phase S (Jorgensen et al., 2002, Novak et al., 1998). Dans le cas de cellules de *S. tuberosum*, en déficience de Fe, celles-ci pourraient être plus petite ce qui empêcherait le passage à travers la phase S du cycle cellulaire. En sachant que les cellules de *Solanum tuberosum* poussant dans un milieu +Fe ou -Fe présentent des différences significatives pour la phase S du cycle cellulaire, mais également une différence significative dans l'accumulation de poids frais, nous avons étudié les activités enzymatiques et/ou les niveaux d'expression protéique de certaines enzymes responsables de la fourniture de précurseurs d'ADN, telles que la G6PDH, la 6 — PGDH, la RNR et la NDPK.

Les niveaux d'expression relative de la G6PDH ont été calculés à partir de l'immunodétection de l'enzyme. On peut observer qu'à travers les jours de culture, on ne peut

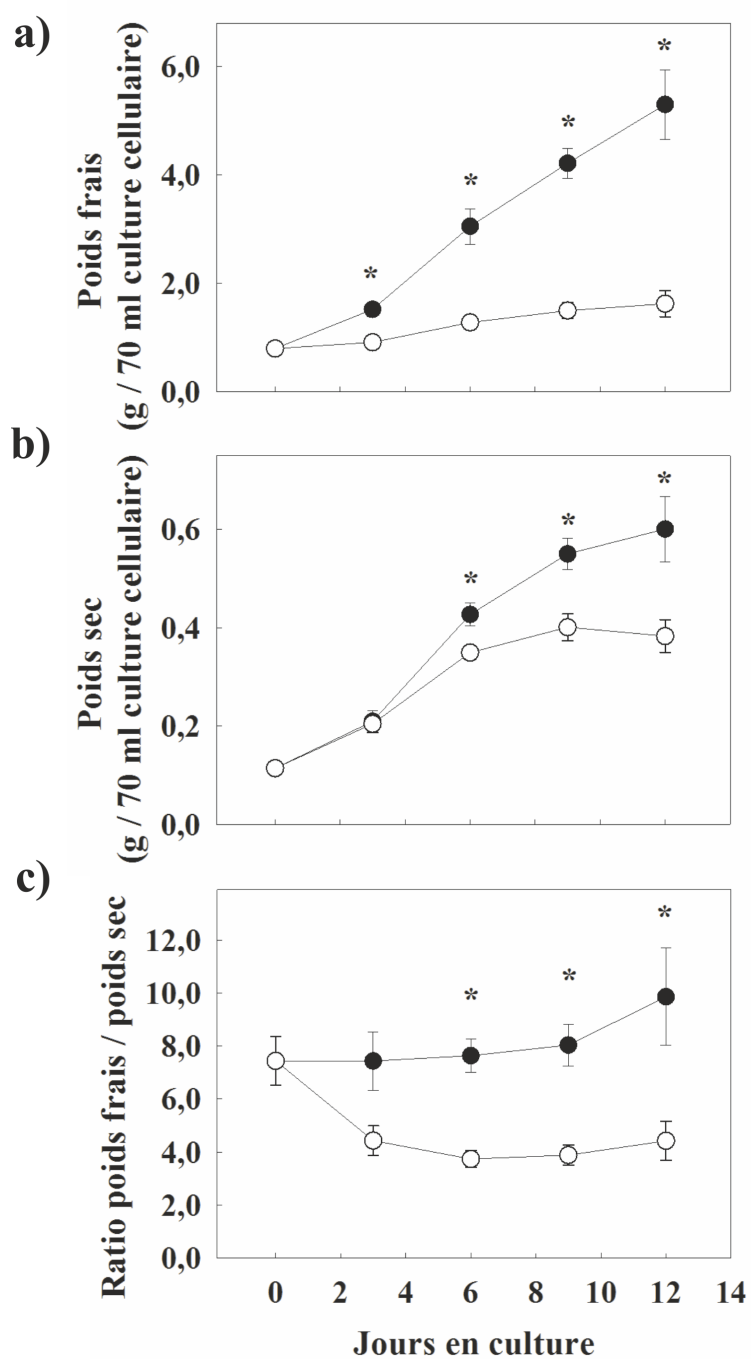


Figure 3. Poids frais (a) et poids sec (b) par erlenmeyer de cultures cellulaires de *Solanum tuberosum*. Rapport poids frais sur poids sec (c). Les cellules étaient cultivées en absence de Fe (ronds blancs) et en présence de Fe (ronds noirs). Le volume total de culture par erlenmeyer est de 70 mL. Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux traitements (test t,  $P < 0,05$ )

pas détecter de différence significative (fig. 4). Chez une autre espèce, *Parietaria judaica*, des résultats semblables pour l'activité de la G6PDH ont été obtenus (Tato et al., 2013). On peut en conclure, que la régulation de l'activité de la G6PDH, et du flux de C à travers la VPP en déficience de Fe, n'est pas contrôlée par une modification de la quantité d'enzymes présentes dans la cellule. La possibilité qu'une modification post-traductionnelle de la G6PDH intervienne n'est pas à écarter. La G6PDH des plastides est en effet connue pour être régulée par un mécanisme redox médié par le système ferrédoxine/thiorédoxine (Kruger & von Schaewen, 2003). Il a également été observé chez *Arabidopsis* que lorsque le site de phosphorylation de la G6PDH est muté, l'activité de celle-ci diminue significativement (Dal Santo et al., 2012).

L'activité de la 6-PGDH a été mesurée par essais enzymatiques *in vitro*. La mesure d'activité ne démontre aucun changement entre les cellules suffisantes ou déficientes en Fe (fig. 5a). La quantité de protéine 6-PGDH a été évaluée par immunodétection. Le résultat présenté est une seule réplique de l'expérience, celle-ci aura besoin de répliqués pour pouvoir déterminer la tendance générale de son expression relative. Sur l'immunodétection présentée, il est possible de voir une augmentation du signal au cours du cycle de culture, mais il n'y a pas de différence notable entre les deux traitements pour chaque jour de culture (fig. 5b, c). Il y a trois bandes, dont le niveau d'expression de chacune d'elles et le même obtenu en les combinant c'est pourquoi les niveaux d'expression relative de ces bandes ne sont pas présentés séparément. L'augmentation de l'expression au cours du cycle peut avoir une autre raison d'être que la réponse au stress, cela pourrait être étudié avec d'autres expériences. L'expression relative entre les traitements n'est pas affectée par la déficience en Fe. L'activité de cette enzyme n'est pas influencée par la quantité de la protéine ni par la déficience en Fe. Chez d'autres organismes, on peut parfois observer une légère augmentation des niveaux des ARNm de la 6-PGDH (Thimm et al., 2001). Cependant, dans cette dernière étude, la déficience en Fe n'était pas totale, car les plantes étaient approvisionnées en Fe les premiers jours de culture, et on les privait de Fe momentanément au moment de faire les analyses.

L'activité de la NDPK a été mesurée par des essais enzymatiques *in vitro*. Durant toute la durée de la culture, l'activité NDPK ne change pas de façon significative (fig. 6a). L'expression relative de la NDPK a été estimée par immunodétection (fig. 6b, c). Bien que les

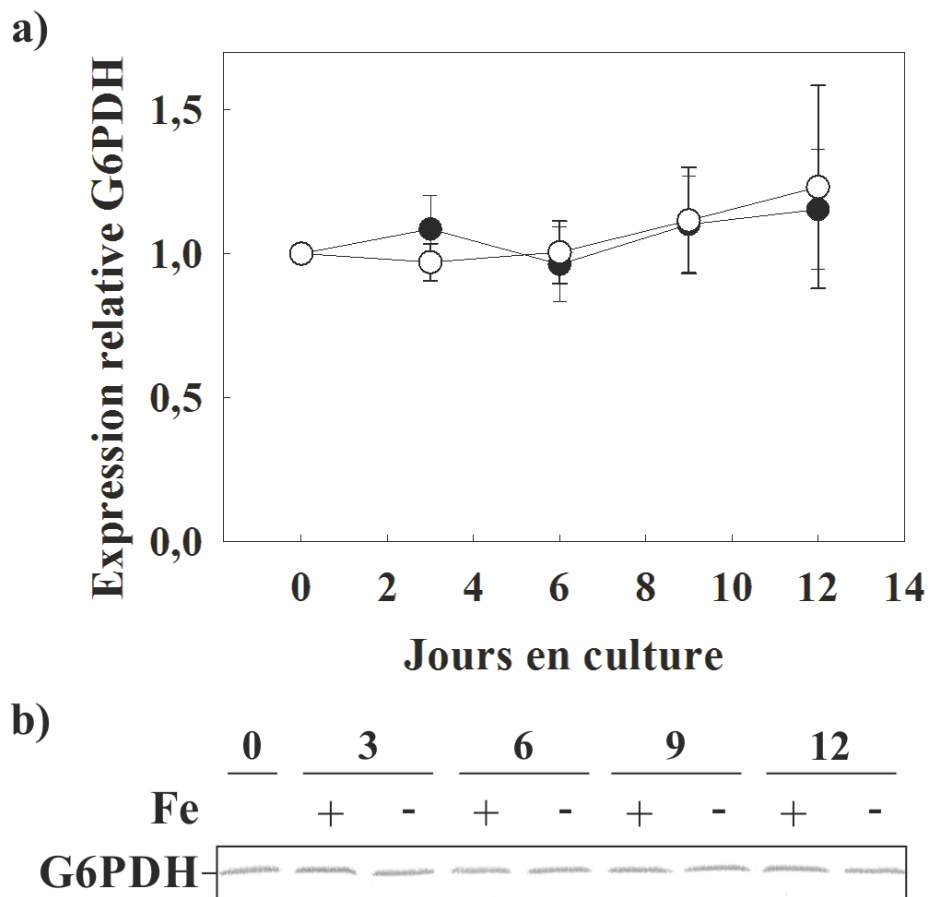


Figure 4. Immuno-quantification de la G6PDH. (a) Analyse de densitométrie, par le logiciel ImageJ, des immunodétections obtenues au cours d'un cycle de culture en présence (ronds noirs) ou déficience de Fe (ronds blancs). L'information est présentée comme un facteur d'expression relative en comparant la quantification de la protéine, pendant les différents jours du cycle, au jour 0. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois. (b) Immunodétection avec des anticorps contre la G6PDH cytosolique. Les pistes ont été chargées avec 12  $\mu$ g de protéines d'une extraction protéique des cultures cellulaires de *S. tuberosum*. L'immunodétection présentée en (b) est un résultat représentatif.

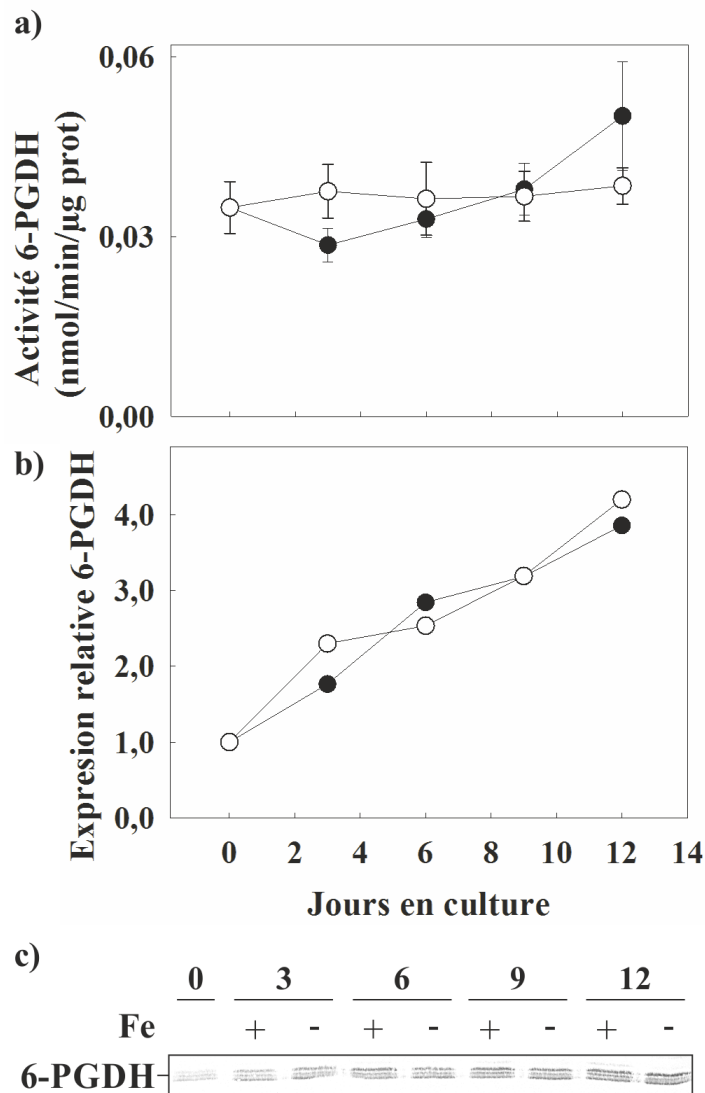


Figure 5. Activité et quantification de la 6-PGDH présente dans les cellules de *S. tuberosum*. (a) Activité in vitro de la 6-PGDH en présence (ronds noirs) ou absence (ronds blancs) de Fe. Le graphique représente 6 répétitions indépendantes. (b) Analyse de densitométrie, par le logiciel ImageJ, des immunodétections contre la 6-PGDH obtenues au cours d'un cycle de culture en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (ronds blancs). L'information est présentée comme un facteur d'expression relative en comparant la quantification de la protéine, pendant les différents jours du cycle, au jour 0. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois. (c) Immunodétection avec des anticorps contre la 6-PPDH cytosolique. Les pistes ont été chargées avec 12  $\mu$ g de protéines d'une extraction protéique des cultures cellulaires. L'immunodétection présentée en (b) est un résultat représentatif.

niveaux de la NDPK étaient légèrement plus bas dans les cultures –Fe, les différences n'étaient pas significatives.

Pour la RNR, uniquement la quantité de la protéine a été analysée par immunodétection. Comme pour les autres enzymes impliquées dans la fourniture de précurseurs d'ADN étudiées ici, on n'observe aucune différence significative à travers le cycle de culture (fig. 7), bien que le niveau RNR était légèrement plus élevé dans les cultures — Fe. Il est à noter que chez les mammifères l'expression de la grande sous-unité est constitutive, elle est donc produite tout au long du cycle cellulaire, avec une expression relative plus grande lors de la phase S (Johansson et al., 1998). La petite sous-unité, elle, n'est exprimée que pendant la phase S du cycle cellulaire (Pham et al., 2002).

De toutes les enzymes capables de fournir des précurseurs pour la synthèse d'ADN, le résultat le plus surprenant est l'absence d'effet de la nutrition en Fe sur l'expression relative de la RNR. En effet, la RNR est une protéine possédant deux Fe coordonnés par des carboxylates (Nordlund et Eklund, 1995) qui est critique pour la progression à travers le cycle cellulaire (Wang et Liu 2006). Elle est affectée par la disponibilité en Fe dans plusieurs modèles eucaryotes (Sansvisens et al., 2013). On s'est donc interrogés à savoir si une différence prononcée serait apparente si l'on prolongeait le stress de quelques jours. Ainsi, on a mesuré son expression relative, au sixième jour d'un deuxième cycle en carence de Fe (total de 20 jours dans un milieu carencé en Fe) (fig. 8). Pour un stress prolongé, on peut observer que les cellules sont viables, mais que les différences dans l'accumulation du poids frais sont plus marquées que lors du cycle de culture précédent. Lors de cette carence prolongée, il est possible de voir que l'expression de l'enzyme RNR est différente entre les traitements +Fe et — Fe, avec un niveau plus élevé dans la culture déficiente en Fe. Il est donc intéressant de constater que les cellules végétales carencées en Fe maintiennent et même augmentent légèrement leur contenu en RNR, une enzyme Fe-dépendante essentielle pour la synthèse et la réparation de l'ADN. Chez la levure en carence de Fe on a aussi une préservation de cette protéine à la suite de mécanismes de modification de localisation subcellulaire (Sanvisens et al., 2011).

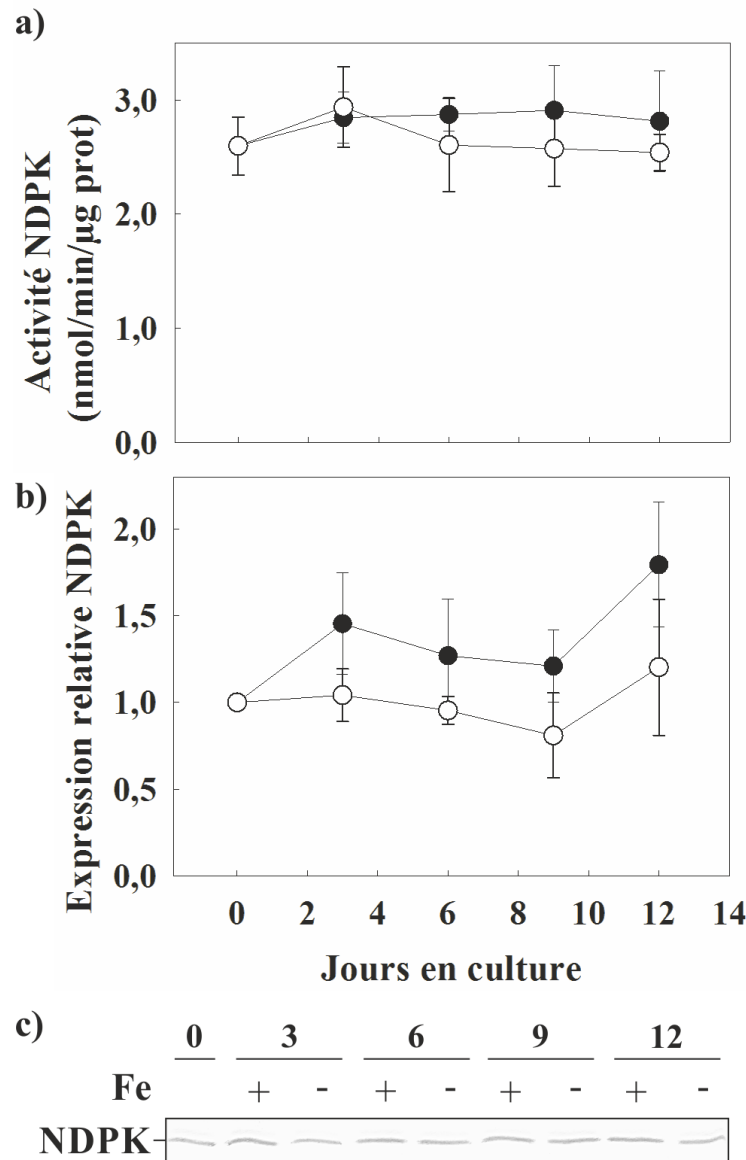


Figure 6. Activité et quantification de la NDPK présente dans les cellules de *S. tuberosum*. (a) Activité in vitro de la NDPK en présence (ronds noirs) ou absence (ronds blancs) de Fe. Le graphique représente 6 répétitions indépendantes. (b) Analyse de densitométrie, par le logiciel ImageJ, des immunodétections contre la NDPK obtenues au cours d'un cycle de culture en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (ronds blancs). L'information est présentée comme un facteur d'expression relative en comparant la quantification de la protéine, pendant les différents jours du cycle, au jour 0. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois. (c) Immunodétection avec des anticorps contre la NDPK. Les pistes ont été chargées avec 12  $\mu$ g de protéines d'une extraction protéique des cultures cellulaires. L'immunodétection présentée en (c) est un résultat représentatif.



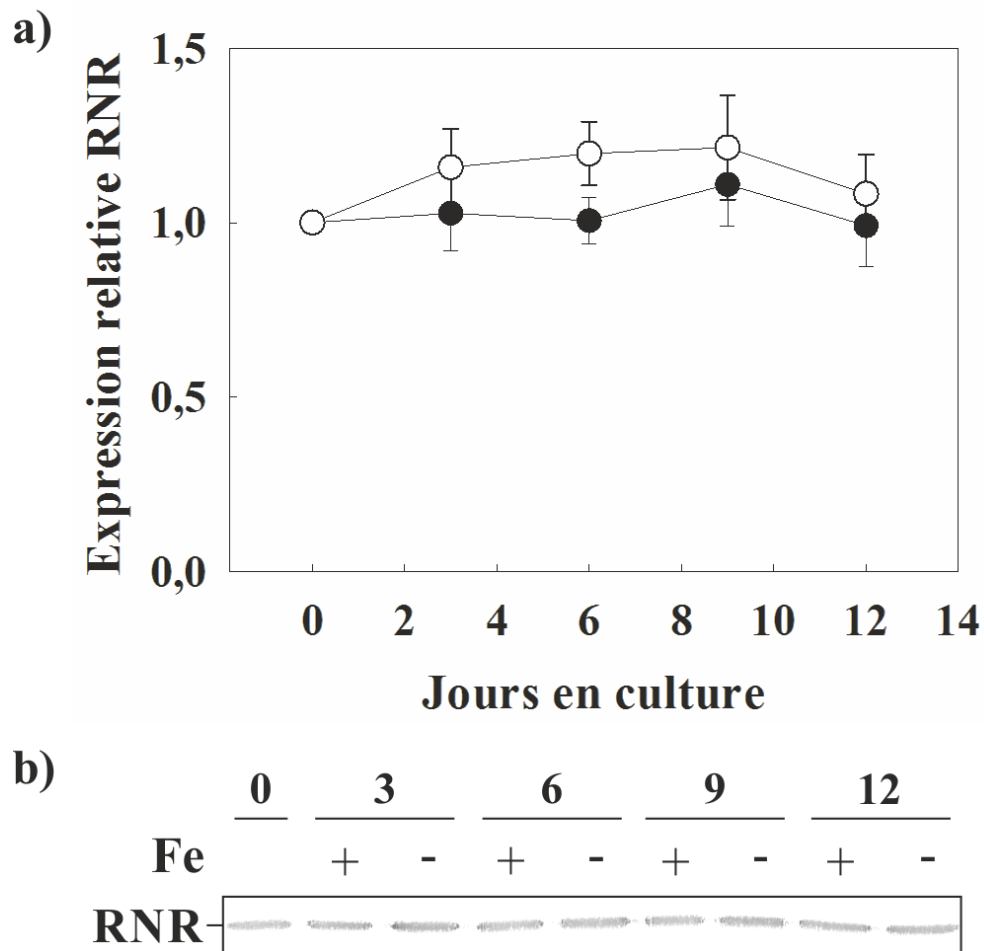
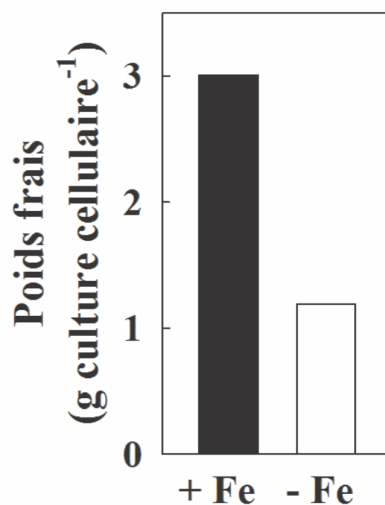


Figure 7. Quantification de la RNR. (a) Analyse de densitométrie, par le logiciel ImageJ, des immunodétections contre la RNR obtenues au cours d'un cycle de culture en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (ronds blancs). L'information est présentée comme un facteur d'expression relative en comparant la quantification de la protéine, pendant les différents jours du cycle, au jour 0. Les expériences ont été répétées au moins 6 fois. (b) Immunodétection avec des anticorps contre la RNR. Les pistes ont été chargées avec 12 µg de protéines d'une extraction protéique des cultures cellulaires de *S. tuberosum*. L'immunodétection présentée en (b) est un résultat représentatif.

(a)



(b)

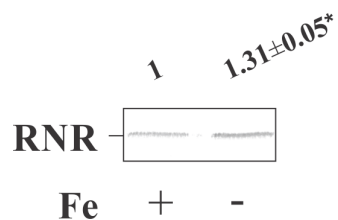


Figure 8. Effet d'un stress prolongé sur le poids frais et le niveau de la RNR. (a) Poids frais au 6ème jour de culture sans Fe après un premier cycle de culture dans un milieu - Fe. (b) Immunodétection sure des extraits protéiques des échantillons présentés en (a) avec des anticorps contre la RNR. Les chiffres au-dessus des bandes correspondent à l'analyse du western blot par densitométrie. L'immunodétection présentée en (b) est un résultat représentatif.

Finalement, nous avons également cherché à vérifier si la différence observée dans la proportion de cellules en phase S au cours des premières heures de la culture (Fig. S1) pouvait être liée à des différences dans l'expression des enzymes étudiés ci-dessus pour des temps plus courts. Nous avons donc mené des études par immunoblot pour évaluer la quantité des protéines pour ces quatre enzymes sur un laps temps de 48 heures (fig. 9). Comme on peut l'observer sur les immunodétections, nous ne pouvons pas détecter de différence notable entre les cellules +Fe et — Fe pour chaque jour de culture.

L'ensemble de ces résultats indique que les changements observés dans la phase S du cycle cellulaire chez les cellules +Fe et -Fe (Fig. S1) ne sont pas reliés à une diminution de l'expression relative et l'activité des quatre enzymes que nous avons étudiés. Nous n'avons donc pas trouvé de lien entre une diminution observée des cellules en phase S et une modulation de l'expression d'enzymes clés impliquées dans la fourniture de précurseurs pour la biosynthèse de précurseurs de l'ADN. Il faudra donc chercher d'autres causes pour cet effet de la carence en Fe sur le cycle cellulaire. La différence de poids frais pourrait être due à d'autres processus biologiques. Il est possible que la déficience en Fe perturbe d'autres processus biologiques qui sont essentiels à la division et à la croissance cellulaire. Par exemple, chez le phytoplancton, la déficience en Fe entraîne une diminution de l'assimilation d'azote, qui est essentielle à la croissance de cellules (Sunda & Huntsman, 1997) et à la formation des bases azotées. Plusieurs enzymes de la voie d'assimilation de l'azote (nitrate) contiennent du Fe, si celui-ci est absent, ces enzymes ne pourront pas fonctionner correctement ou être exprimées en grandes quantités et la cellule ne pourra pas acquérir l'azote nécessaire à sa croissance (Borlotti et al., 2012). Plusieurs autres exemples existent, la déficience en Fe affecte également la synthèse de pigments photosynthétiques (Thoirion et al., 1997), la photosynthèse (Pereira et al., 2013) ou encore le métabolisme de protéines des plastides (Spence et al., 1991).

Il ne faut également pas oublier que pour les quatre enzymes étudiés ici l'activité *in vitro* ou même le niveau d'expression des protéines n'est pas forcément représentatif des flux métaboliques *in vivo*. Avec des études de mesures d'activités de flux *in vivo*, il serait alors possible de corrélérer des flux métaboliques des voies de biosynthèse des précurseurs de l'ADN,

avec les mesures d'accumulation de biomasse ou de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Ces flux sont en effet plus représentatifs du métabolisme cellulaire. Ces approches de mesure de flux des voies de biosynthèse des précurseurs de l'ADN sont envisageables à plus long terme, car elles vont nécessiter le développement de méthodes spécifiques. Cependant, l'application de méthodes nécessaires pour l'évaluation de flux dans le métabolisme carboné et énergétique est un autre sujet important de ma maîtrise.

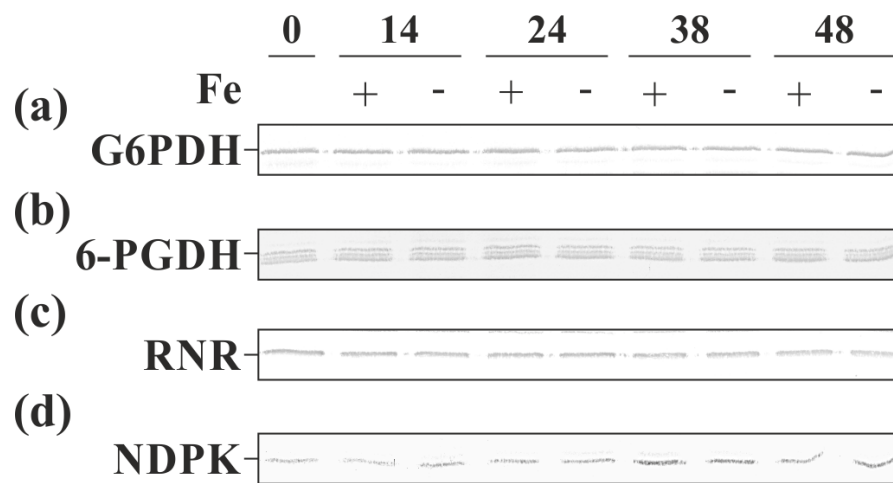


Figure 9. Immunodétection des protéines responsables de la fourniture des précurseurs pour la synthèse d'ADN dans les deux premiers jours du cycle de culture. (a) G6PDH. (b) 6-PGDH. (c) RNR. (d) NDPK. Les expériences ont été répétées au moins 2 fois. Les pistes ont été chargées avec 12  $\mu$ g de protéines d'une extraction protéique des cultures cellulaires de *S. tuberosum*. Les immunodétections présentées sont des résultats représentatifs

## **3.2 Métabolisme énergétique**

### **3.2.1 Flux carbonés et répartition du carbone dans la cellule**

La première étape de la stratégie 1 utilise de l'ATP qui est un produit du métabolisme énergétique. Le saccharose est dégradé en  $\text{CO}_2$  par le métabolisme carboné (principalement la glycolyse et le cycle de Krebs) et la cellule peut ainsi produire des métabolites énergétiques nécessaires à son fonctionnement. En utilisant un précurseur comme le saccharose radioactif, il est possible de mesurer le flux de carbone entre le saccharose et le  $\text{CO}_2$ , donc la vitesse à laquelle la cellule métabolise ce sucre. En connaissant la radioactivité spécifique (e.g. dpm/ $\mu\text{mol}$ ) du saccharose dans le milieu au départ de l'expérience, la quantité de  $\text{CO}_2$  radioactif produit par les cellules durant l'expérience et le poids frais de cellules utilisées, il est possible de mesurer ce flux exprimé en  $\mu\text{mol}$  de saccharose consommé par unité de temps et par unité de poids frais. Il est possible de mesurer également la consommation totale en saccharose en sachant la quantité de saccharose radioactif et sa radioactivité spécifique introduite au début de l'expérience et la radioactivité résiduelle dans le milieu après la fin de l'expérience. On peut également estimer la répartition du catabolisme du saccharose entre différents produits dans la cellule, en fractionnant par chromatographie le contenu cellulaire, en composés neutres, acides et basiques.

#### **Optimisation des conditions de marquage**

Afin de mettre au point les marquages, nous avons dû déterminer le temps d'incubation nécessaire pour que les cellules intègrent une quantité de saccharose importante pour remplacer les pools de saccharose «froids» présents dans la cellule (fig. 10). L'utilisation de saccharose durant le temps d'incubation n'étant pas parfaitement linéaire, il a été décidé que l'on prendrait deux points différents, un après deux heures d'incubation et l'autre après cinq heures d'incubation. Dans la période de temps entre deux et cinq heures, la production de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir du saccharose radioactif atteint une valeur maximale indiquant que le système est à l'équilibre métabolique et isotopique. En comparant la radioactivité de ces deux points, on peut également estimer la quantité de saccharose pris par la cellule pour un laps de trois heures.

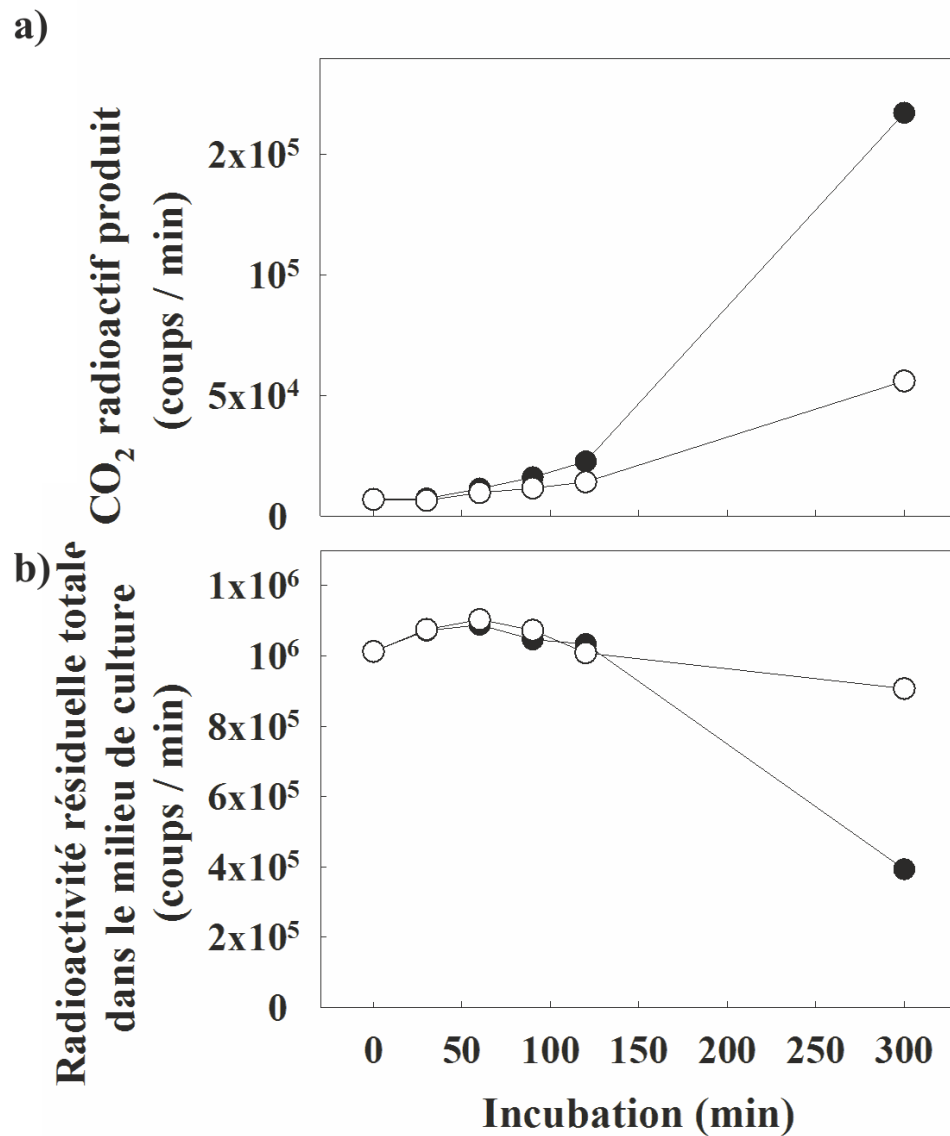


Figure 10. Optimisation du marquage au saccharose radioactif (<sup>14</sup>C). Mesure du flux de dégradation du saccharose au J9 de cellules de *S. tuberosum* ayant été cultivées en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (rond blancs). (a) <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produit par les cellules. (b) radioactivité résiduelle dans le milieu.

### **Les flux de consommation et de dégradation du saccharose sont quatre à cinq fois plus faibles en condition de déficience de Fe**

Pour la consommation de saccharose, il y a des différences significatives entre les traitements +Fe et -Fe à partir du jour 6 (fig. 11). Quant au flux de dégradation de saccharose, ce dernier est d'une grande importance, car jusqu'à présent, il n'existe pas de données concernant la vitesse à laquelle les sucres sont catabolisés par la glycolyse en absence de Fe. Dans le cas des cultures cellulaires étudiées ici la consommation de saccharose (fig. 11) et le flux entre le saccharose et le CO<sub>2</sub> (fig. 12) suivent une même tendance. Comme on peut l'observer, en carence de Fe la dégradation du saccharose en CO<sub>2</sub> après 6 jours de stress est de 4 à 5 fois plus faible qu'en conditions normales. Ces données sont en accord avec les résultats concernant les mesures de croissance des cellules en carence de Fe qui est plus faible qu'en présence de Fe. On peut penser que le métabolisme du sucre est ralenti et qu'en conséquence, les cellules -Fe produisent moins d'énergie et donc, croissent moins. Cette situation correspond à une dépression du métabolisme qui serait associée au stress de Fe. Lors d'autres études menées sur des espèces à Stratégie 1, on observe une augmentation d'activité de certaines enzymes du métabolisme carboné (Espen et al., 2000, Sijmons & Bienfait, 1983, Rabotti et al., 1995, M'sehli et al., 2009, Jelali et al., 2010), de leur abondance protéique (Donnini et al., 2010, Rodríguez-Celma et al., 2011, Li et al., 2008) ou de la quantité de leur transcrit (Thimm et al., 2001 ). Ces observations sont souvent interprétées dans la littérature comme une indication d'une augmentation du métabolisme carboné et donc du flux carboné en déficience de Fe. Cependant, il a souvent été démontré que l'augmentation du niveau d'expression des enzymes que ce soit par des mécanismes transcriptionnels ou postranscriptionnels n'est pas toujours synonyme d'augmentation du flux métabolique de la voie dans laquelle elles participent (Rivoal & Hanson, 1993b, Even et al., 2003, Fernie et al., 2005).

La réponse de dépression métabolique mise en évidence ici ressemble à celle que l'on peut trouver en anoxie dans certains systèmes (Geigenberger, 2003, Geigenberger et al., 2000). En manque d'oxygène, on peut observer une diminution du flux de la glycolyse, de la consommation et de la dégradation du saccharose ainsi qu'une augmentation de l'activité des

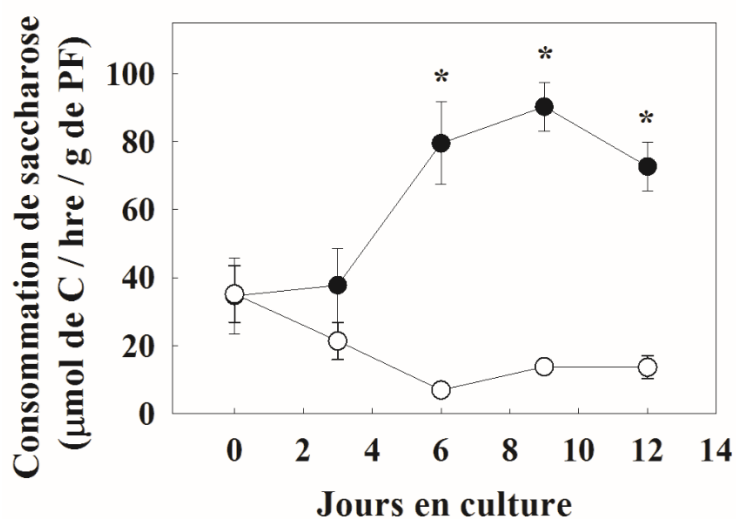


Figure 11. Consommation du saccharose extracellulaire par des cellules de *S. tuberosum* ayant été cultivées en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (rond blancs). Les mesures ont été faites en fournissant du saccharose marqué ( $^{14}\text{C}$ ). Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux traitements (test t,  $P < 0,05$ ).

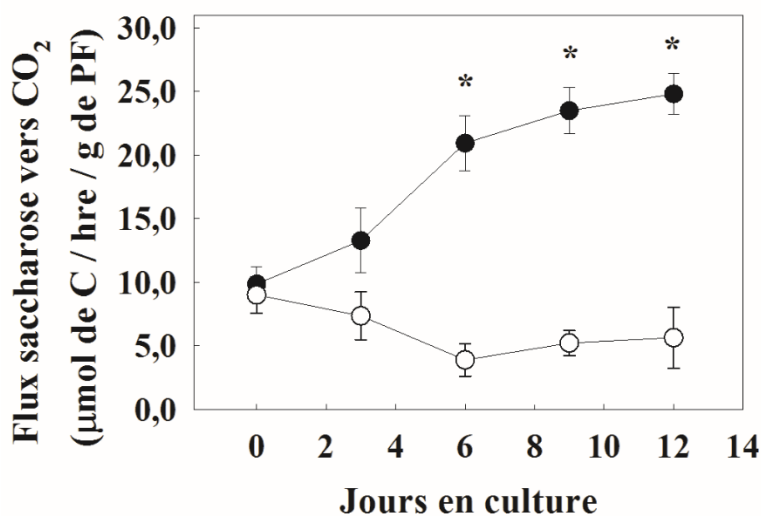


Figure 12. Flux de dégradation du saccharose en  $\text{CO}_2$  dans les cellules de *S. tuberosum* ayant été cultivées en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (rond blancs). Les mesures ont été faites en fournissant du saccharose marqué ( $^{14}\text{C}$ ) et récoltant le  $^{14}\text{CO}_2$  produit par la plante. Le  $^{14}\text{CO}_2$  récupéré indique la quantité de sucre qui a été utilisé par les cellules. Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux traitements (test t,  $P < 0,05$ ).



voies de fermentation et accumulation d'acide lactique et/ou d'éthanol (Geigenberger, 2003, Greenway & Gibbs, 2003, Maeda et al., 2001). De cette façon, la cellule végétale ralentit son métabolisme et sa consommation en O<sub>2</sub> pour continuer à fournir des métabolites énergétiques sans pour autant dépendre de la consommation d'oxygène alors que celui-ci est disponible en des faibles quantités comparativement aux conditions normales (Geigenberger, 2003). En déficience de Fe, l'activité de certaines enzymes de la chaîne de respiration est affectée de telle sorte que leur activité diminue considérablement, cela doit être encore plus sérieux dans un cas où la carence de Fe est totale dans le milieu, en sachant que pour fonctionner correctement les mitochondries auraient besoin de 40 atomes de Fe par unité respiratoire (Vigani & Zocchi, 2009). En effet, souvent il y a une corrélation entre le Fe intracellulaire et le carbone capable d'être assimilé par la cellule (Sunda & Huntsman, 1997).

Dans le cas d'une carence en Fe, la dépression du métabolisme peut être imputée en partie à la chaîne des électrons qui ne fonctionne pas à plein potentiel. Les complexes I et II sont les plus affectés, car ils contiennent une quantité importante d'atomes de Fe (20 et 10 atomes respectivement) (Vigani et al., 2009). Ce sont ces complexes qui assurent le mouvement d'électrons dans la chaîne respiratoire. En éliminant complètement le Fe du milieu, la synthèse de ces complexes est possiblement moindre ou peut-être inexistante. De ce fait, la chaîne de transport d'électrons est moins efficace et cela se répercute sur l'ensemble du métabolisme, qui est par conséquent ralenti.

En comparant le flux de dégradation et la consommation de saccharose à partir du milieu, on n'observe, pour la plupart, aucune différence significative entre les traitements (fig. 13) au cours du cycle de culture. On peut donc affirmer que la proportion de carbone importé sous forme de saccharose et qui est catabolisé vers le CO<sub>2</sub> reste relativement similaire entre les deux traitements. On peut cependant remarquer qu'en déficience de Fe pour le J6 le flux du saccharose vers le CO<sub>2</sub> est moins importante dans les cellules -Fe (fig. 13). Ceci pourrait être le résultat d'une accumulation de saccharose qui pourrait être nécessaire à la stratégie de *S. tuberosum* pour contrecarrer la carence en Fe. Chez d'autres espèces on observe également une accumulation de saccharose en déficience de Fe (Lin et al., 2016, Jiménez et al., 2011). Il a déjà été montré que le saccharose pourrait servir comme signal pour déclencher différents processus biologiques (Rolland et al., 2006). Il se peut que pour les cellules de *S. tuberosum* le

saccharose soit nécessaire pour déclencher une cascade de signalisation pour activer la réponse en déficience de Fe (Chen et al., 2010). Chez d'autres espèces, il existe une cascade qui commence par l'auxine et se termine par l'activation du facteur de transcription FIT. Ce dernier active la transcription de FRO2 et IRT1, deux protéines importantes intervenant chez les espèces à stratégie 2 en carence de Fe (Bauer et al., 2007, Colangelo & Guerinot, 2004). Récemment, il a été montré que le saccharose agit en amont de la cascade (Li et al., 2016) et que les facteurs de transcription bHLH34 et bHLH104 sont en partie responsables de la stimulation de la transcription de FIT (Li et al., 2016). La cascade devient donc Suc->auxine->NO->bHLH34 / bHLH104->FIT (*Fe-deficiency induced Transcription Factor*) -> Transcription FRO2 et IRT1. Le sucrose augmente la quantité d'auxine de façon à activer la cascade. Il est possible que chez les cellules de *S. tuberosum* une accumulation de saccharose soit utile à l'activation d'une cascade de signalisation également. Cet aspect pourrait être approfondi dans de prochaines études. Il faudrait notamment évaluer si le niveau de saccharose est véritablement plus élevé dans les cellules carencées dans notre système et si le 2,4D (analogue de l'auxine) utilisé dans le milieu interfère avec le fonctionnement de la cascade.

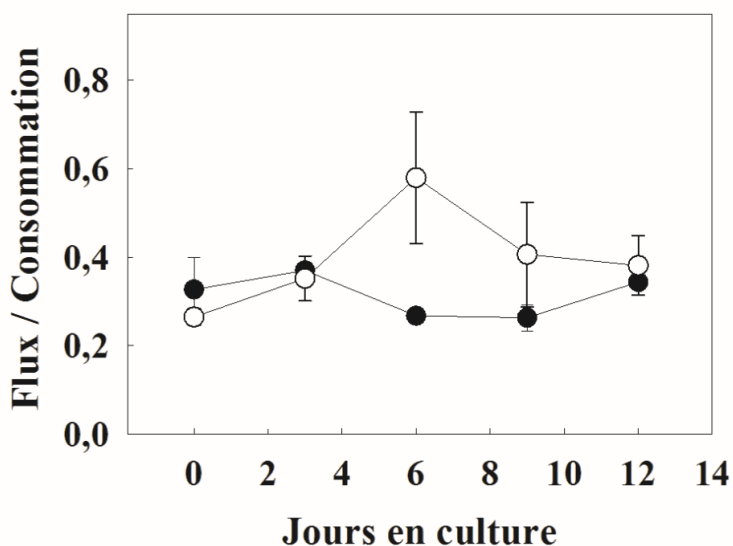


Figure 13. Rapport entre la quantité de C transportée sous forme de saccharose à partir du milieu et sa dégradation vers le CO<sub>2</sub> dans les cellules de *S. tuberosum* ayant été cultivées en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (rond blancs). Les données utilisées pour faire le graphique proviennent des fig. 11 et 12.

## Répartition du C dans les fractions neutres, acides, basiques et CO<sub>2</sub>

La répartition de carbone dans chacune des fractions ne change pas entre les traitements +Fe et –Fe (fig. 14). Il n’y a aucune différence significative entre les traitements à travers le cycle de culture. Cela indique que qualitativement, il n’y a pas de grande différence entre les cellules +Fe et –Fe pour la proportion de C acheminé vers la production de molécules acides (e.g. acides organiques) ou basiques (e.g. acides aminés). Le métabolisme ne change donc pas dramatiquement en fonction de la disponibilité du Fe puisque la distribution de carbone dans les différentes fractions se fait de la même façon dans les deux traitements. Cependant, il ne faut pas oublier que la consommation en sucre et le flux de dégradation du saccharose sont nettement plus faibles dans les cellules déficientes en Fe (Fig. 12). La quantité de carbone qui est assimilée par la cellule est plus faible et donc la quantité de carbone distribuée dans la cellule –Fe est moindre. Ainsi, de façon quantitative, le métabolisme change. Ces données sont des indicateurs qui montrent que pour répondre au stress de carence en Fe, les cellules de *S. tuberosum* en culture réagissent principalement en ralentissant leur métabolisme.

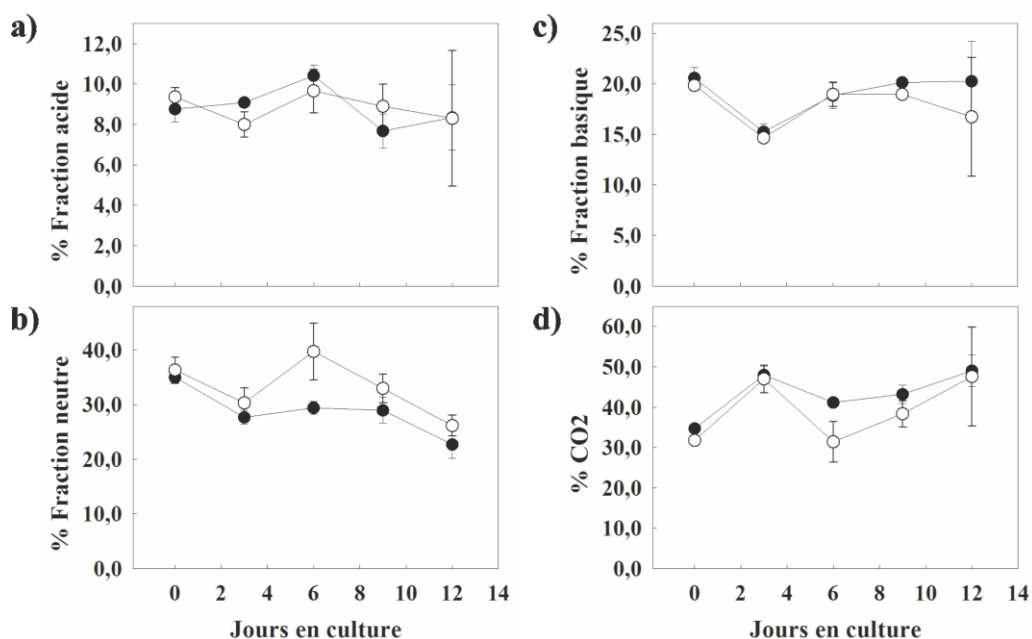


Figure 14. Répartition du <sup>14</sup>C dans les portions acide (a), basique (b), neutre (c) et dans le CO<sub>2</sub> (d) pour les cellules de *S. tuberosum* en absence (ronds blancs) ou en présence (ronds noirs) de Fe, après cinq heures de marquage. Les résultats sont représentés comme pourcentage du sucre radioactif total ayant été métabolisé par la cellule.

### 3.2.2 Flux anaplérotique et expression de la PEPC en carence de Fe

#### Établissement des conditions de marquage

La technique de marquage isotopique pour la mesure du flux anaplérotique dans les cellules n'était pas établie au laboratoire lorsque mon projet a commencé. Afin d'avoir les conditions optimales de marquage, nous avons mis au point cette technique. Pour cela, nous avons testé certaines conditions telles que la quantité de radioactivité utilisée, la radioactivité spécifique du traceur, ainsi que la quantité de cellules et le temps de marquage à utiliser. La durée nécessaire pour s'assurer que le  $\text{CO}_2$  avait bien disparu suite au traitement acide à la fin de la période d'incubation a également été optimisée. Dans la fig. 15, on peut voir les résultats typiques obtenus lors de l'optimisation des paramètres de marquage. Le jour de culture utilisé pour ce test est J9 et les conditions de marquage ont été les mêmes que celles écrites au matériel et méthodes à l'exception qu'ici la radioactivité spécifique du bicarbonate est de  $0,926 \mu\text{Ci} / \mu\text{mol}$  de C et les points de marquage sont 10, 20, 30 et 60 min. Les résultats montrent une fixation relativement linéaire du  $^{14}\text{CO}_2$  dans des produits stables à l'acide au cours du temps. La vitesse la plus rapide est obtenue entre 0 et 10 minutes de marquage. Ces données indiquent que le système est à l'équilibre isotopique et métabolique dès le début de l'incubation (Salon et al., 1988). C'est pourquoi nous avons utilisé une durée de marquage de 10 min pour les expériences subséquentes.

Un paramètre important à optimiser était le temps d'incubation nécessaire pour éliminer le  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  non incorporé dans des molécules organiques suite au traitement acide utilisé pour terminer le marquage. Le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé suite à ce traitement acide a été mesuré suite à un marquage dans lequel on a attendu 30, 60, 90, 120 et 180 minutes après injection de la solution acide pour mesurer la radioactivité présente dans le piège de KOH ( $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  non fixé) et dans le milieu. Comme on peut voir sur la fig. 16, la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  peut être récupérée en presque totalité dès les trente premières minutes. Nous avons néanmoins décidé d'utiliser une incubation de trois heures pour les expériences suivantes afin de minimiser la radioactivité résiduelle de  $\text{CO}_2$  qui pourrait rester dans le milieu, car ceci pourrait fausser l'estimation de la quantité de radioactivité résistante à l'acide (acides organiques et acides aminés) formée au cours de l'incubation avec le traceur.

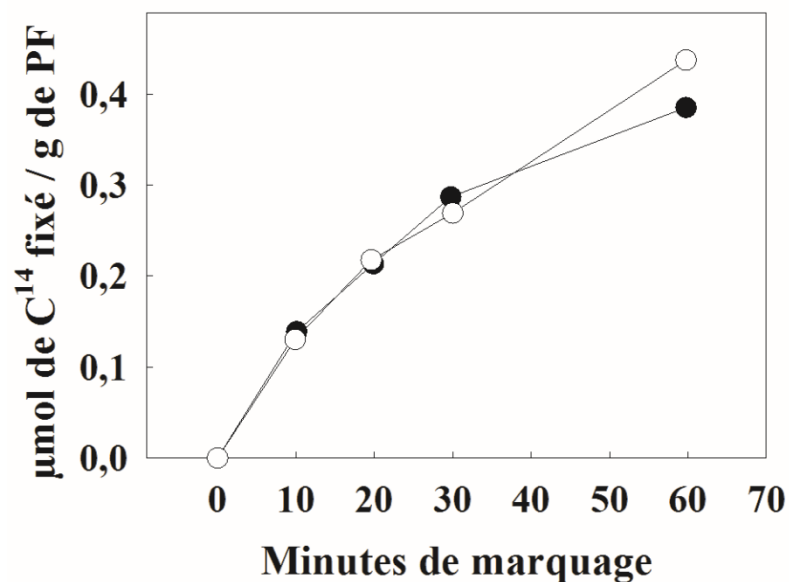


Figure 15. Exemple de production de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir du  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  lors de l'optimisation de la méthode de marquage isotopique. Le calcul du flux à travers la PEPC (en  $\mu\text{mol}$  de C pour g de PF) est fait à partir de la radioactivité résiduelle retrouvée dans le milieu après traitement à l'acide:  $^{14}\text{CO}_2$  fixé par les cellules de *S. tuberosum* en déficience (ronds blancs) ou en suffisance de Fe (ronds noirs). Chacun des marquages a été fait avec 50 mg de poids frais.

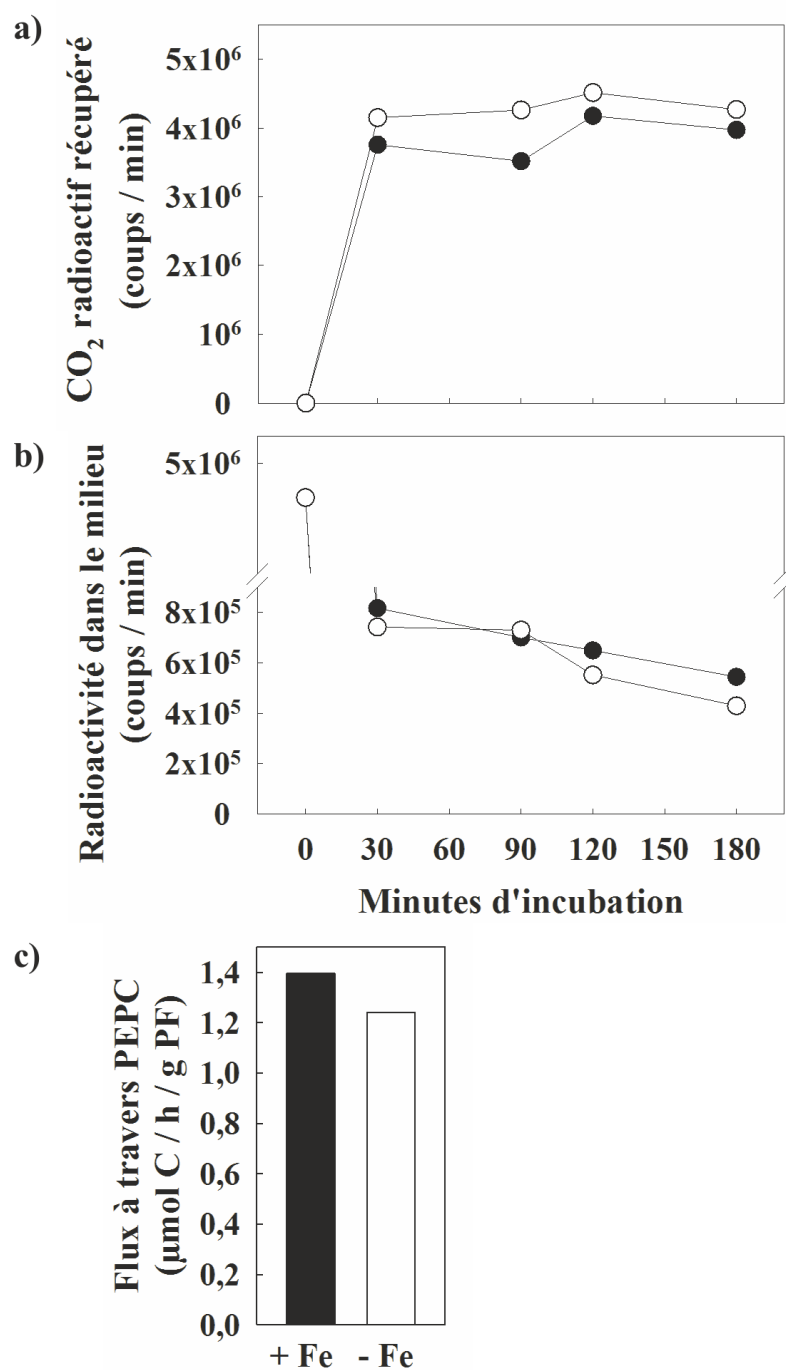


Figure 16. Optimisation du marquage au  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ . (a)  $^{14}\text{CO}_2$  radioactif récupéré après acidification du milieu. (b) Radioactivité résiduelle dans le milieu. (c) flux de C à travers la PEPC calculé à partir des résultats. Ce marquage a été réalisé avec des cellules au neuvième jour de culture en déficience (symboles blancs) et suffisance (symboles noirs) de Fe.

### **La déficience en Fe n'augmente pas le flux de C à travers la PEPC**

Après avoir optimisé les paramètres de marquage, le flux de carbone à travers la PEPC a été déterminé pour les cellules +Fe et -Fe au cours du cycle de culture. Les résultats montrent que ce flux anaplérotique est significativement plus élevé en suffisance de Fe aux jours 3, 6 et 9 (fig. 17). Ces résultats sont explicables par le fait que cette période est celle pour laquelle l'accumulation de biomasse et la division cellulaire sont les plus actives. Ceci pourrait expliquer un besoin pour la synthèse de molécules qui sont utiles à la croissance et division de cellules. Pour soutenir la croissance, la cellule doit synthétiser de nombreuses molécules organiques et ceci est possible grâce au cycle de Krebs. Ce métabolisme mène à la synthèse des acides aminés et produit le pouvoir réducteur pour plusieurs réactions biochimiques (Melzer & O'Leary, 1987, Wang et al., 2010, Atkin et al., 2000). Ces flux biosynthétiques sont soutenus par l'action de la PEPC (O'Leary et al., 2011). Par la suite dans les cellules +Fe aux J9 et J12, il y a une diminution du flux à travers la PEPC. On peut expliquer ceci par le fait que les cellules ralentissent leur croissance et l'accumulation de poids sec (fig. 3). Il est possible que le métabolisme soit ralenti après la phase de croissance initiale et surtout que certains des éléments nutritifs du milieu puissent avoir été partiellement épuisés et donc être moins disponibles pour la cellule. En déficience de Fe, nous observons des flux anaplérotiques plus faibles pour les cellules J3 à J9 comparativement aux cellules +Fe. Il y aurait donc moins de processus de synthèse dans les cellules -Fe, ce qui pourrait expliquer le flux plus faible à travers la PEPC. Ceci s'ajoute aux résultats obtenus précédemment dans lequel on a vu qu'il y a moins de C catabolisé par les cellules -Fe à partir du saccharose. Par conséquent, la quantité de C distribuée vers la respiration (production de CO<sub>2</sub>) est bien plus faible en déficience de Fe. On peut cependant s'apercevoir en examinant ces données que, comparativement au flux catabolique du saccharose, le flux anaplérotique de la PEPC est relativement préservé en condition de carence en Fe. En effet, dans les cellules -Fe, le flux anaplérotique de la PEPC est au plus deux fois plus faible que dans les cellules +Fe, alors que le flux catabolique du saccharose est quatre à cinq fois plus bas dans les mêmes conditions. Les cellules -Fe ralentissent alors leur métabolisme, ce qui affecte les flux de carbone à travers la PEPC ainsi que sa régulation. Dans le cas présent, nous avons cherché à déterminer si la quantité de l'enzyme PEPC dans les cellules pouvait être affectée par la carence. Les résultats obtenus

suggèrent que l'expression de la PEPC ne semble pas être la responsable des changements de flux observés *in vivo*. L'analyse par immunodétection montre en effet que la quantité de la protéine PEPC ne change pas de façon significative durant le cycle de culture (fig. 18). Il est possible que la régulation de la PEPC soit post-traductionnelle, par des métabolites ou par la phosphorylation, comme mentionné dans l'introduction.

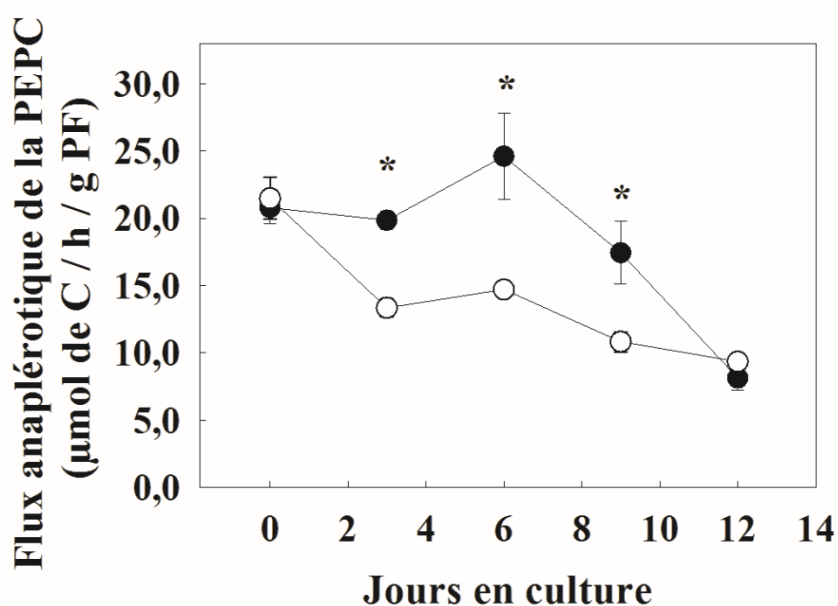


Figure 17. Flux anaplérotique de la PEPC des cellules de *S. tuberosum* ayant été cultivées en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (rond blancs). Il a été mesuré en fournissant du bicarbonate marqué ( $^{14}\text{C}$ ). Le carbone est incorporé dans des molécules organiques résistantes à l'acide. La radioactivité incorporée est mesurée et sert au calcul du flux de la PEPC. Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux traitements (test t,  $P < 0,05$ ).



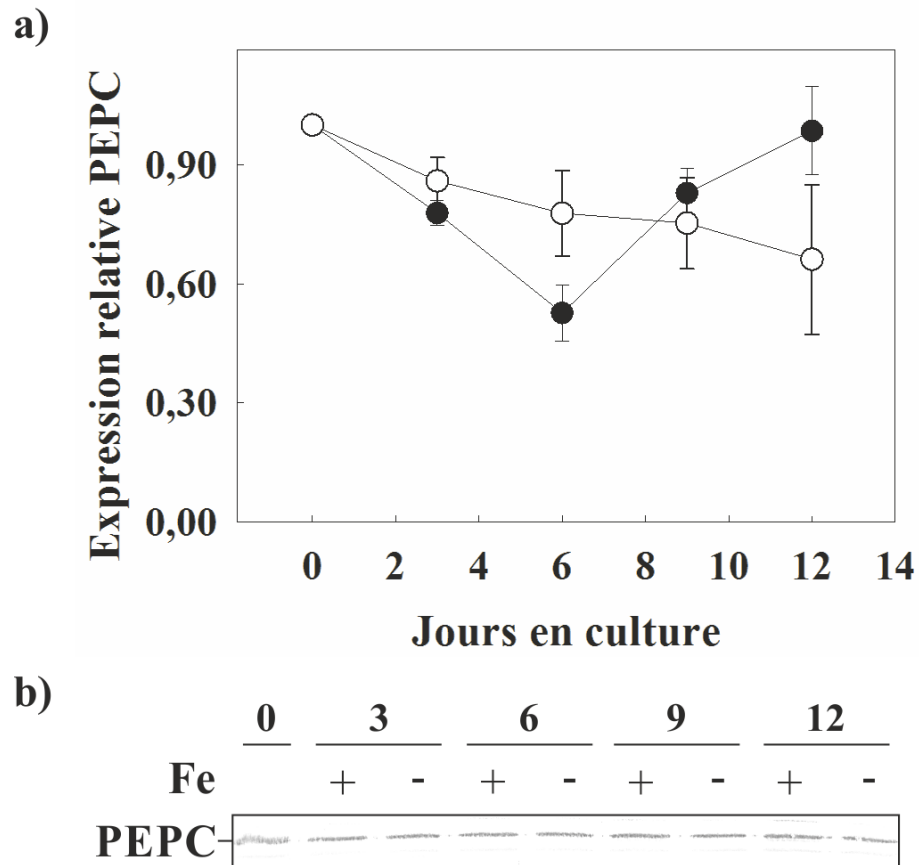


Figure 18. Quantification de la PEPC par immunodétection. (a) Analyse de densitométrie, par le logiciel ImageJ, des immunodétections obtenues au cours d'un cycle de culture en présence (ronds noirs) ou déficience de Fe (ronds blancs). L'information est présentée comme un facteur d'expression relative en comparant la quantification de la protéine, pendant les différents jours du cycle, au jour 0. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois. (b) Immunodétection avec des anticorps contre la PEPC. Les pistes ont été chargées avec 12  $\mu$ g de protéines d'une extraction protéique des cultures cellulaires de *S. tuberosum*. L'analyse par immunoblot est un résultat représentatif.

Le flux du cycle de Krebs est élevé si la demande en ATP est élevée (Williams et al., 2008). La quantité de carbone utilisé par le cycle de Krebs reflète l'état énergétique des cellules et la demande en précurseurs biosynthétiques et en ATP (Williams et al., 2008, Schwender et al., 2006). Si les conditions sont optimales pour la croissance, les cellules synthétiseront en grandes quantités des molécules permettant la division cellulaire et des fonctions vitales au maintien de la cellule. Ceci implique d'avoir des squelettes carbonés prêts à servir de précurseurs pour la synthèse de diverses molécules. Le cycle de Krebs peut former plusieurs de ces précurseurs, mais pour les transformer en produits finaux la cellule a besoin d'ATP c'est pourquoi lorsque la demande d'ATP est faible dans les cellules, le flux à travers le cycle de Krebs descend ou il reste très faible (Poolman et al., 2009). C'est ce qui semble arriver en déficience de Fe dans les cultures cellulaires de *S. tuberosum*. Dans cette condition, il est très probable que les cellules aient besoin d'une moindre quantité de squelettes carbonés fournis par la PEPC pour soutenir le métabolisme ou la croissance. De ce fait, le flux de la PEPC est faible comparativement à celui des cellules en suffisance de Fe. De plus, en carence de Fe il y a une baisse du régime métabolique, dont la PEPC en fait partie.

En réponse à d'autres stress, on a souvent observé que le flux à travers le cycle de Krebs est affecté: soit stimulé ou bien réprimé. Ces changements se font souvent par un remaniement du cycle qui peut alors fonctionner de façon non cyclique ou en utilisant des voies de contournement (Nunes-Nesi et al., 2005, Sweetlove et al., 2010, Fait et al., 2008). Ceci sert à optimiser la réponse en approvisionnant la cellule avec des métabolites nécessaires à la réponse au stress (Greenway & Gibbs, 2003). En cas de baisse du flux dans le cycle de Krebs, l'entrée de C par la PEPC peut également diminuer (Williams et al., 2008). Cela pourrait également être le cas ici en déficience de Fe. Il se pourrait que le cycle soit ralenti et que la PEPC n'ait pas à réapprovisionner le cycle de Krebs de la même façon qu'en suffisance de Fe. De plus, parmi les enzymes du cycle de Krebs, deux d'entre elles contiennent du Fe dans leur structure; l'aconitase et la succinate déshydrogénase (complexe II de la chaîne respiratoire et enzyme du cycle de Krebs) (Huang & Millar, 2013). Chez les racines de concombre, la déficience en Fe diminue considérablement l'activité de la SDH (Vigani et al., 2009). Il en va de même dans les cellules de sycomore (Pascal & Douce, 1993). On peut supposer qu'en déficience de Fe l'activité ou l'expression de ces enzymes sont diminuées.

également et que cela pourrait affecter de façon négative certaines étapes du cycle de Krebs. Il pourrait donc y avoir un remaniement du cycle de Krebs qui lui permettrait de continuer à fonctionner et à fournir des squelettes carbonés à la cellule, bien qu'à un niveau très faible (Vigani, 2012).

### **3.2.3 Dosage des pyridines nucléotides en déficience de Fe**

La deuxième étape de la stratégie 1 consiste à réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ , forme assimilable par la plante. Cette étape utilise du pouvoir réducteur et l'utilisation préférentielle de NADH ou NADPH dépend de l'espèce. Le pouvoir réducteur provient du métabolisme énergétique de la cellule, en premier lieu du cycle de Krebs sous la forme de NADH. Trois enzymes du cycle de Krebs (ICDH,  $\alpha$ -CDH, NDH) sont impliqués dans ce processus. La VPP produit du NADPH, au niveau des deux premières enzymes (G6PDH et 6-PGDH) de la voie. Les formes oxydées et réduites de ces métabolites importants ont été mesurés par des essais de spectrophotométrie dans les cellules +Fe et -Fe.

#### **Les pools de NADPH augmentent de façon transitoire au début de la déficience de Fe**

Suite à ces dosages, on note une augmentation modeste des niveaux de NAD et de NADH après trois jours de culture en condition +Fe et -Fe (fig. 19 a, b). Le NADP et le NADPH suivent également la même tendance (fig. 19 c, d). Ces changements reflètent probablement l'augmentation de l'activité métabolique nécessaire pour assurer la croissance au début du cycle de culture. On remarque également que les pools de NADPH augmentent plus fortement dans les cultures -Fe (fig. 19 d). À la suite de cette période initiale de culture, les niveaux de NADPH baissent en condition -Fe pour les cellules au J9 et J12. De façon intéressante, on retrouve donc un rapport NADPH/NADP plus élevé en condition -Fe au début de la culture (fig. 20 b), alors que les rapports NADH/NAD sont similaires pour tous les jours de traitement dans les deux cultures (fig. 20 a). Une première explication de ces résultats est que la privation de Fe mène à une augmentation transitoire du flux à travers la VPP en début de culture, même si, comme on l'a vu plus haut, le niveau des enzymes clés de la voie n'est

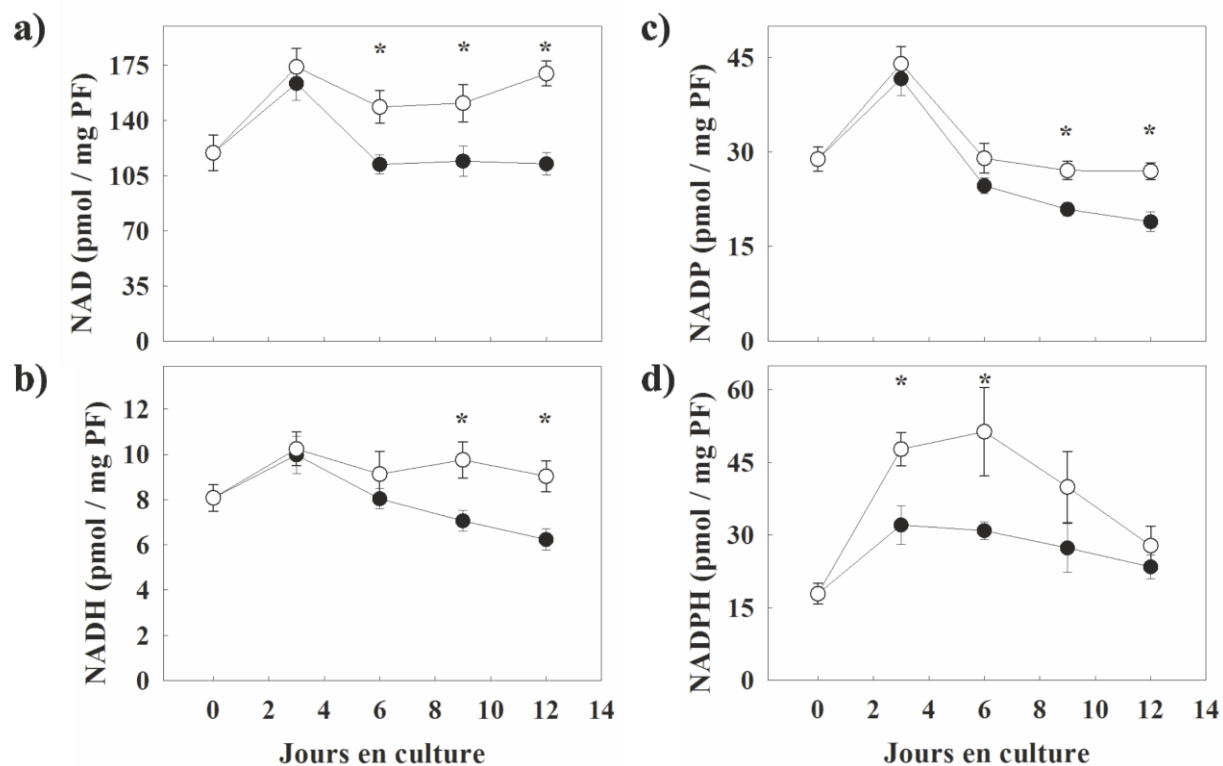


Figure 19. Mesures des pools de pyridines nucléotides intracellulaires en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (ronds blancs) dans les cultures de *S. tuberosum*. (a) NAD<sup>+</sup>. (b) NADH. (c) NADP<sup>+</sup>. (d) NADPH. Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux traitements (test t,  $P < 0,05$ )

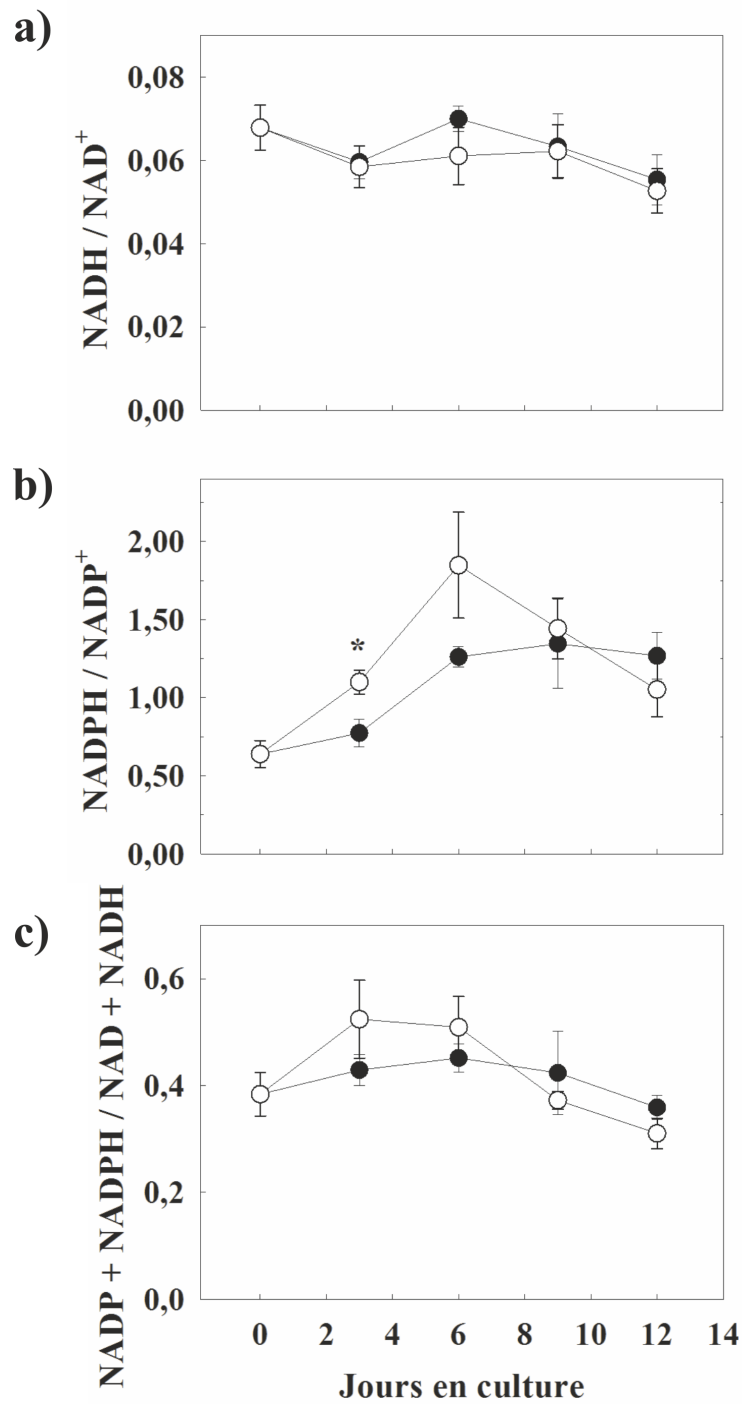


Figure 20. Rapports des pools de NAD<sup>+</sup>/NADH (a), de NADP<sup>+</sup>/NADPH (b) et NADP+NADPH/NAD+NADH (c) dans les cultures cellulaires de *S. tuberosum* en présence (ronds noirs) ou absence de Fe (ronds blancs). Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux traitements (test t,  $P < 0,05$ ).

pas affecté par le stress. Il est possible que l'augmentation de flux à travers la VPP soit stimulée par l'abondance de nutriments dans le milieu MS dans lequel les cellules sont cultivées. Cette augmentation de flux fournirait du NADPH qui peut être utilisé pour alimenter la FC-R en pouvoir réducteur (Sijmons et al., 1984b, Vigani & Zocchi, 2009, Bienfait, 1985, Weger & Espie, 2000). Cette possible augmentation du flux de C à travers la VPP qui devra être vérifiée lors d'expériences futures pourrait donc être une réponse adaptative au manque de Fe. Une deuxième raison pour l'augmentation de NADPH dans les cellules -Fe provient du fait que cette molécule est aussi utilisée par la cellule pour détoxifier les ROS, par exemple par le système de la glutathion peroxydase, de la TRx/Trx réductase et le cycle ascorbate/glutathion (Møller, 2001, Pollak et al., 2007). Le Fe est une molécule pro-oxydante. L'excès de Fe est en effet connu pour causer une surproduction de ROS alors que les bas niveaux de Fe diminuent normalement les ROS (Vigani et al., 2013, Reyt et al., 2015). Les ROS sont souvent formés lors d'un stress oxydatif, mais ils peuvent être produits également à un niveau basal par la respiration (Møller, 2001). En déficience de Fe, les cellules de *S. tuberosum* ont un métabolisme ralenti comme montré précédemment et, par conséquent la respiration devrait produire moins de ROS, le NADPH produit alors par les cellules en déficience de Fe est moins utilisé. Il est donc peu probable que l'augmentation de NADPH constatée lors de la phase initiale de carence en Fe dans les cultures soit causée par un besoin de dissiper un niveau plus élevé de ROS. Cependant, il est à noter que certains enzymes antioxydants contenant du Fe comme la catalase, la peroxydase, l'ascorbate peroxydase et la superoxyde dismutase à Fe peuvent être affectés négativement par une carence en Fe (Vigani et al., 2013). Ceci pourrait induire un déséquilibre des processus de détoxification des ROS entraînant ainsi une augmentation de NADPH. Cette hypothèse mériterait d'être évaluée dans notre système. Une troisième explication semble cependant plus plausible pour expliquer l'augmentation constatée de NADPH. Cette explication est liée à la dépression métabolique constatée chez les cellules -Fe. Il est bien connu que le NADPH est la forme de pouvoir réducteur nécessaire pour de nombreux processus de biosynthèse comme entre autres, l'assimilation de l'azote, la synthèse de lignine, d'acides gras et de polyphénols (Pryke & ap Rees, 1977, Agrawal & Canvin, 1971, Hay & Schwender, 2011, Spielbauer et al., 2013, Fukuoka & Enomoto, 2001, Esposito et al., 2003, Alonso et al., 2010). Normalement, une partie du NADPH produit par la cellule est également oxydée par la chaîne respiratoire des

électrons (Geigenberger & Fernie, 2014). Comme nous l'avons vu avec les résultats précédents, la carence en Fe cause une diminution générale de la croissance, du métabolisme et du flux catabolique des sucres vers le CO<sub>2</sub>. On peut penser que cette situation occasionne de faibles taux de biosynthèse pour plusieurs classes de molécules impliquées dans la croissance telles les squelettes carbonés servant à la synthèse de précurseurs d'ADN, d'acides aminés, de lipides membranaires ou de composés pariétaux. Certaines études portant sur la quantification des flux métaboliques dans des cultures cellulaires ont montré qu'au début du cycle de culture, en phase exponentielle de croissance, la plupart des flux biosynthétiques sont à leur maximum (Rontein et al., 2002). De plus, le flux à travers la VPP n'est pas forcément ajusté à la demande de pouvoir réducteur biosynthétique (Masakapalli et al., 2013). La diminution marquée de la croissance en condition -Fe pourrait donc occasionner une augmentation du rapport NADPH/NADP puisque les processus biosynthétiques seraient diminués dans cette situation. Le NADP quant à lui s'accumule, il ne semble pas être utilisé vers la fin du cycle de culture (fig. 19c). Également, il est possible que cette accumulation soit le résultat d'une augmentation de la biosynthèse de NADP dans les conditions de suffisance en Fe ou d'une action combinée de ces deux événements.

### **Les niveaux de pyridines nucléotides sont plus élevés dans les cellules carencées**

La chaîne de transport des électrons mitochondriale utilise le NADH produit par le cycle de Krebs et elle est responsable de la régénération de NAD<sup>+</sup> dont sont dépendantes certaines enzymes de ce dernier. Ainsi il y a un lien serré entre les deux processus et l'un peut influencer l'autre (Plaxton & Podestá, 2006b). Le ratio NAD<sup>+</sup>/NADH peut ainsi influencer les flux métaboliques de ces deux processus. Par exemple, en hypoxie les ratios diminuent et cela limite l'action de la GAPDH qui est NAD<sup>+</sup> dépendante (Geigenberger & Fernie, 2014). Dans le cas des résultats présentés à la Figure 16a, le ratio NAD<sup>+</sup>/NADH ne change pas. Cependant, on peut voir que les niveaux de NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, NADH et NADPH sont généralement plus élevés en déficience de Fe (fig. 19a). Dans des études précédentes, le contenu cellulaire en pyridine nucléotides a été lié à la phase de croissance exponentielle. Par exemple, quand des cellules en phase exponentielle de croissance sont diluées dans du milieu nutritif, on a une

augmentation marquée des pools de NAD et NADH (Pellny et al., 2009). À l'inverse, les cellules ayant atteint la phase stationnaire ont des pools réduits (Pellny et al., 2009). Les niveaux plus bas de pyridines nucléotides enregistrés vers les jours J6-J12 dans les cultures +Fe sont donc probablement liés au fait que chez ces cultures, la phase exponentielle de croissance est dépassée. Dans un stress tel que l'hypoxie, on peut aussi observer des changements dans les ratios de pyridines nucléotides et ceux-ci peuvent affecter l'activité de certaines enzymes intervenant dans le métabolisme carboné. Par exemple la PDC (pyruvate dehydrogenase complex) et l'ICDH sont inhibés fortement par le NADH est sont probablement fortement influencées par les ratios  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (Plaxton & Podestá, 2006b). Le NADH est produit principalement par les enzymes du cycle de Krebs afin de réduire la chaîne de transport d'électrons (Geigenberger & Fernie, 2014). Dans le cas où la chaîne de transport d'électrons est moins active à cause du stress de carence de Fe, la cellule utilisera moins de NADH et par conséquent le  $\text{NAD}^+$  n'aura pas besoin d'être réduit et c'est cette forme qui s'accumule préférentiellement d'où l'augmentation en carence de Fe. Par exemple, le complexe I de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale est la principale enzyme responsable de l'oxydation de NADH (Møller, 2001), mais comme mentionné plus haut, en déficience de Fe le complexe I de la chaîne respiratoire est grandement affecté. On peut supposer alors que le NADH est peu consommé, il s'accumule menant également à une accumulation de NAD. On peut observer une situation similaire chez un mutant de *Nicotiana sylvestris* dont le complexe 1 est non-fonctionnel, il y a une accumulation de NAD et NADH (Dutilleul et al., 2005). Dans ce contexte, le NADH n'est pas dissipé par les déshydrogénases alternatives qui ont une relativement faible affinité pour cette molécule (Dutilleul et al., 2005). Cependant, cet aspect n'a pas été encore mesuré dans les cultures cellulaires de *S. tuberosum*, il serait donc intéressant de mesurer l'activité du complexe 1 ou étudier si la structure de la protéine est modifiée en carence de Fe.

Dans les cultures cellulaires de *S. tuberosum*, il y a donc une accumulation des pyridines nucléotides. Celles-ci pourraient être moins utilisées pendant la déficience en Fe, ce qui supporte l'hypothèse d'une dépression du métabolisme. L'hypothèse que cette accumulation observée en déficience de Fe soit le résultat d'une stimulation de la synthèse de NAD et NADP en réponse au stress de carence en Fe est également une piste envisageable



pour expliquer ces résultats. Le NAD est formé *de novo* à partir du quinolinate et en situation de stress la synthèse de NAD est parfois stimulée afin de maintenir un ratio élevé NAD:NADH pour éviter l'inhibition des déshydrogénases de la glycolyse et du cycle de Krebs (Noctor, 2006). Le NADP(H) est fait à partir de la phosphorylation du NAD(H) par des kinases (NADK) (Noctor, 2006). Chez *Arabidopsis*, pendant des stress tels, les stress osmotique, oxydatif et les basses températures, les pools de NADP(H) sont principalement remplis par l'activité de la NADK, plutôt que par la régénération de la VPP, dont l'expression augmente durant ces stress. (Chai et al., 2006). Il faudrait donc mesurer l'activité de ces différents enzymes dans les cultures +Fe et -Fe.

## Conclusion

Dans ce projet, je me suis intéressée principalement au métabolisme énergétique en déficience de Fe et de façon plus spécifique à plusieurs enzymes impliqués dans la fourniture de précurseurs pour la synthèse d'ADN ainsi que dans le métabolisme énergétique. Dans une première partie, j'ai étudié la G6PDH, la 6-PGDH, la NDPK et la RNR. Les mesures d'expression relative au cours du stress par immunodétections ainsi que la mesure des activités enzymatiques ont permis de conclure que les différences précédemment observées dans le cycle cellulaire lors de la carence n'étaient pas corrélées avec le niveau d'expression de ces enzymes. Cependant, il a été possible d'observer des différences dans l'expression relative de la RNR après 20 jours de culture en déficience de Fe. Ces données indiquent que les différences observées dans l'effet d'une source de Fe sur le cycle cellulaire ne sont pas liées à des différences dans l'expression de plusieurs enzymes clés du métabolisme des nucléotides. Il est possible que les flux métaboliques dans les voies de fourniture de précurseurs pour la synthèse d'ADN soient affectés par la carence en Fe. Cet aspect devra être évalué dans le futur en développant des techniques de traçage métabolique spécifiques à ces voies.

J'ai ensuite effectué des mesures de deux flux carbonés importants du métabolisme primaire. L'analyse des flux carbonés réalisée, en utilisant une source de  $^{14}\text{C}$ , soit du saccharose radioactif pour la mesure du flux de dégradation de celui-ci ou du bicarbonate marqué pour la mesure du flux de C à travers la PEPC, a démontré qu'en déficience de Fe, il y a une baisse du métabolisme carboné. Le flux de dégradation du saccharose a baissé en déficience de Fe, alors qu'en suffisance il a augmenté significativement et atteint son point le plus haut dans les derniers jours du cycle. Quant au flux de C à travers la PEPC celui-ci a également diminué en déficience de Fe et en suffisance de Fe, le flux était significativement plus élevé dès les premiers jours de culture. Cette situation de dépression métabolique est possiblement due à une baisse de Fe intracellulaire qui est un cofacteur pour plusieurs réactions biochimiques dans la cellule (telles la respiration, la biosynthèse d'acides aminés et synthèse d'acide gras). On peut donc conclure que si le Fe n'est pas disponible, la cellule ralentit son métabolisme pour maintenir ses fonctions de base et assurer sa viabilité dans ces conditions. Cette situation n'avait pas été découverte auparavant en carence en Fe. Elle est

cependant similaire à ce qui advient dans plusieurs modèles végétaux soumis à des situations d'hypoxie ou d'anoxie. Les cellules en déficience de Fe prolifèrent plus lentement que les cellules en suffisance de Fe, ce qui baisse la nécessité de molécules organiques nécessaires à des processus de biosynthèse. Le cycle de Krebs étant une source de squelettes de carbone, celui-ci n'a pas besoin de fonctionner à un taux élevé en déficience de Fe, l'entrée de carbone dans le cycle est donc diminuée, comme on a pu observer en mesurant le flux de la PEPC. De plus, en mesurant la répartition de C dans chacune des fractions (neutre, acide, base) on a pu observer que la cellule ne cherche pas à augmenter la production d'une fraction en particulier pour survivre au stress. La distribution reste la même pour chacune des fractions, seulement dans une moindre quantité. Finalement, la mesure des pools de pyridines nucléotides par spectrophotométrie a permis de constater que ces métabolites s'accumulent en déficience, ce qui corrobore la baisse du métabolisme marquée entre les deux traitements. En déficience de Fe, il est possible que plusieurs réactions biosynthétiques nécessitant du pouvoir réducteur soient réprimées, ce qui mène à une augmentation transitoire du rapport NADPH/NADP.

L'ensemble de ces résultats pointe vers une conclusion majeure : en situation de déficience de Fe, le métabolisme carboné des cultures cellulaires de *S. tuberosum* diminue fortement. Cette stratégie de diminution des besoins métaboliques permet aux cellules de s'adapter à une situation de stress qui restreint leur capacité à produire de l'énergie.

## Bibliographie

- Abadía J, López-Millán A, Rombolà A, Abadía A, 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil* **241**, 75-86.
- Agrawal P, Canvin D, 1971. The pentose phosphate pathway in relation to fat synthesis in the developing castor oil seed. *Plant physiol* **47**, 672-5.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002. Molecular Biology of the cell, 4<sup>e</sup> édition, New York. *Omega*, 1592 pp.
- Alonso A, Dale V, Shachar-Hill Y, 2010. Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis. *Metab Eng* **12**, 488-97.
- Andaluz S, López-Millán A, Peleato M, Abadía J, Abadía A, 2002. Increases in phosphoenolpyruvate carboxylase activity in iron-deficient sugar beet roots: Analysis of spatial localization and post-translational modification. *Plant Soil* **241**, 43-8.
- Arias-Baldrich C, Bosch N, Begines D, Fera AB, Monreal J, García-Mauriño S, 2015. Proline synthesis in barley under iron deficiency and salinity. *J Plant Physiol* **183**, 121-9.
- Atkin O, Millar A, Gardeström P, Day D, 2000. Photosynthesis, Carbohydrate Metabolism and Respiration in Leaves of Higher Plants. In: Leegood R, Sharkey T, Von Caemmerer S, eds. *Photosynthesis*. Springer Netherlands, 153-75. (Advances in Photosynthesis and Respiration; vol. 9.)
- Ayar-Kayali H, 2010. Pentose phosphate pathway flux analysis for glycopeptide antibiotic vancomycin production during glucose-limited cultivation of *Amycolatopsis orientalis*. *Prep Biochem Biotech* **41**, 94-105.
- Balmer Y, Vensel W, Cai N, *et al.*, 2006. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *P Natl Acad Sci USA* **103**, 2988-93.
- Bauer P, Ling H, Guerinot M, 2007. *FIT*, the *FER*-like iron deficiency induced transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **45**, 260-1.
- Bienfait H, 1985. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *J Bioenerg Biomembr* **17**, 73-83.
- Borlotti A, Vigani G, Zocchi G, 2012. Iron deficiency affects nitrogen metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *BMC plant biol* **12**, 189.

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bruinenberg P, Van Dijken J, Scheffers W, 1983. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *J Gen Microbiol* **129**, 953-64.
- Buckhout T, Bell P, Luster D, Chaney R, 1989. Iron-stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) is localized on the plasma membrane. *Plant physiol* **90**, 151-6.
- Cavanaugh P, Porter C, Tukalo D, Frankfurt O, Pavelic Z, Bergeron R, 1985. Characterization of L1210 cell growth inhibition by the bacterial iron chelators parabactin and compound II. *Cancer res* **45**, 4754-9.
- Chai M, Wei P, Chen Q, *et al.*, 2006. NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 665-74.
- Chaney R, Brown J, Tiffin L, 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant physiol* **50**, 208-13.
- Chen K, Gong H, Chen G, Wang S, Zhang C, 2003. Up-regulation of glutathione metabolism and changes in redox status involved in adaptation of reed (*Phragmites communis*) ecotypes to drought-prone and saline habitats. *J Plant Physiol* **160**, 293-301.
- Chen K, Gong H, Chen G, Wang S, Zhang C, 2004. Gradual drought under field conditions influences the glutathione metabolism, redox balance and energy supply in spring wheat. *J Plant Growth Regul* **23**, 20-8.
- Chen W, Yang J, Qin C, *et al.*, 2010. Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*. *Plant physiol* **154**, 810-9.
- Clark S, 2008. Iron deficiency anemia. *Nutr Clin Pract* **23**, 128-41.
- Colangelo E, Guerinot M, 2004. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**, 3400-12.
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta S, Briat J, Walker E, 2001. *Maize yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe<sup>3+</sup> uptake. *Nature* **409**, 346-9.

- Dal Santo S, Stampfl H, Krasensky J, *et al.*, 2012. Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 3380-92.
- Danson J, Wasano K, Nose A, 2000. Infection of rice plants with the sheath blight fungus causes an activation of pentose phosphate and glycolytic pathways. *Eur J Plant Pathol* **106**, 555-61.
- Davies D, 1986. The fine control of cytosolic pH. *Physiol Plantarum* **67**, 702-6.
- De Nisi P, Zocchi G, 2000. Phosphoenolpyruvate carboxylase in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots under iron deficiency: activity and kinetic characterization. *J Exp Bot* **51**, 1903-9.
- De Vos C, Lubberding H, Bienfait H, 1986. Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants. *Plant physiol* **81**, 842-6.
- Dix D, Bridgham J, Broderius M, Byersdorfer C, Eide D, 1994. The *FET4* gene encodes the low affinity  $\text{Fe}^{2+}$  transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 26092-9.
- Donnini S, Prinsi B, Negri A, Vigani G, Espen L, Zocchi G, 2010. Proteomic characterization of iron deficiency responses in *Cucumis sativus* L. roots. *BMC plant biol* **10**, 268.
- Dorion S, Matton D, Rivoal J, 2006. Characterization of a cytosolic nucleoside diphosphate kinase associated with cell division and growth in potato. *Planta* **224**, 108-24.
- Dorion S, Rivoal J, 2003. Quantification of uridine 5'-diphosphate (UDP)-glucose by high-performance liquid chromatography and its application to a nonradioactive assay for nucleoside diphosphate kinase using UDP-glucose pyrophosphorylase as a coupling enzyme. *Anal Biochem* **323**, 188-96.
- Dorion S, Rivoal J, 2015. Clues to the functions of plant NDPK isoforms. *N-S Arch Pharmacol* **388**, 119-32.
- Durrett T, Gassmann W, Rogers E, 2007. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant physiol* **144**, 197-205.
- Dutilleul C, Lelarge C, Prioul J, De Paepe R, Foyer C, Noctor G, 2005. Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrate assimilation and the integration of carbon and nitrogen metabolism. *Plant physiol* **139**, 64-78.

- Eckhardt U, Marques A, Buckhout T, 2001. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol Biol* **45**, 437-48.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot M, 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *P Natl Acad Sci* **93**, 5624-8.
- Espen L, Dell'orto M, De Nisi P, Zocchi G, 2000. Metabolic responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots under Fe-deficiency: a  $^{31}\text{P}$ -nuclear magnetic resonance in-vivo study. *Planta* **210**, 985-92.
- Esposito S, Massaro G, Vona V, Rigano V, Carfagna S, 2003. Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta* **216**, 639-47.
- Even S, Lindley N, Coccagn-Bousquet M, 2003. Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology* **149**, 1935-44.
- Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G, Fernie A, 2008. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci* **13**, 14-9.
- Fernie A, Geigenberger P, Stitt M, 2005. Flux an important, but neglected, component of functional genomics. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 174-82.
- Finegold A, Shatwell K, Segal A, Klausner R, Dancis A, 1996. Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* **271**, 31021-4.
- Fukuoka N, Enomoto T, 2001. The occurrence of internal browning induced by high soil temperature treatment and its physiological function in *Raphanus* root. *Plant Sci* **161**, 117-24.
- Furukawa T, Naitoh Y, Kohno H, Tokunaga R, Taketani S, 1992. Iron deprivation decreases ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis. *Life sci* **50**, 2059-65.
- Geigenberger P, 2003. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 247-56.
- Geigenberger P, Fernie A, 2014. Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxid Redox Sign* **21**, 1389-421.
- Geigenberger P, Fernie A, Gibon Y, Christ M, Stitt M, 2000. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol Chem* **381**, 723-40.

- Gerke J, Beißner L, Römer W, 2000. The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on P uptake by a single root. I. The basic concept and determination of soil parameters. *J Plant Nutr Soil Sc* **163**, 207-12.
- Gibbs J, Greenway H, 2003. Review: mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Funct Plant Biol* **30**, 353-.
- Givan C, 1999. Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biol Rev* **74**, 277-309.
- Greenway H, Gibbs J, 2003. Review: mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintenance and energy distribution to essential processes. *Funct Plant Biol* **30**, 999-1036.
- Große C, Scherer J, Koch D, Otto M, Taudte N, Grass G, 2006. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**, 120-31.
- Guerinot M, 2001. Improving rice yields—ironing out the details. *Nat Biotechnol* **19**, 417-8.
- Guerinot M, Yi Y, 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant physiol* **104**, 815.
- Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, *et al.*, 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* **5**, 950-60.
- Harvest Plus, 2010. Iron. In. (2014.)
- Hauschild R, Von Schaewen A, 2003. Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant physiol* **133**, 47-62.
- Hay J, Schwender J, 2011. Computational analysis of storage synthesis in developing *Brassica napus* L. (oilseed rape) embryos: flux variability analysis in relation to <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Plant J* **67**, 513-25.
- Hell R, Stephan U, 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**, 541-51.
- Herrick J, Sclavi B, 2007. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* **63**, 22-34.
- Hinsinger P, 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* **237**, 173-95.
- Hodges M, 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J Exp Bot* **53**, 905-16.



- Hove-Jensen B, 1988. Mutation in the phosphoribosylpyrophosphate synthetase gene (*prs*) that results in simultaneous requirements for purine and pyrimidine nucleosides, nicotinamide nucleotide, histidine, and tryptophan in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**, 1148-52.
- Huang S, Millar A, 2013. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 344-9.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, *et al.*, 2006. Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup>-phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *Plant J* **45**, 335-46.
- Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y, 2004. Phospho *enol* pyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 69-84.
- Jeanneau M, Vidal J, Gousset-Dupont A, *et al.*, 2002. Manipulating PEPC levels in plants. *J Exp Bot* **53**, 1837-45.
- Jelali N, Dell'orto M, Abdelly C, Gharsalli M, Zocchi G, 2010. Changes of metabolic responses to direct and induced Fe deficiency of two *Pisum sativum* cultivars. *Environ Exp Bot* **68**, 238-46.
- Jiménez S, Ollat N, Deborde C, *et al.*, 2011. Metabolic response in roots of *Prunus* rootstocks submitted to iron chlorosis. *J Plant Physiol* **168**, 415-23.
- Johansson E, Hjortsberg K, Thelander L, 1998. Two YY-1-binding proximal elements regulate the promoter strength of the TATA-less mouse ribonucleotide reductase R1 gene. *J Biol Chem* **273**, 29816-21.
- Jones D, 1998. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant Soil* **205**, 25-44.
- Jorgensen P, Nishikawa J, Bretkreutz B, Tyers M, 2002. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297**, 395-400.
- Kav N, Srivastava S, Goonewardene L, Blade S, 2004. Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. *Ann Appl Biol* **145**, 217-30.
- Krome K, Kabsch U, Aumann J, 2007. The effect of benzothiadiazole and fungal extracts of *Cercospora beticola* and *Fusarium graminearum* on phosphoenolpyruvate carboxylase activity in cucumber leaves. *J Plant Dis Protect* **114**, 250-5.
- Krömer S, Gardeström P, Samuelsson G, 1996. Regulation of the supply of cytosolic oxaloacetate for mitochondrial metabolism via phosphoenolpyruvate carboxylase in

- barley leaf protoplasts I. The effect of covalent modification on PEPC activity, pH response, and kinetic properties. *BBA Gen Subjects* **1289**, 343-50.
- Kruger N, Von Schaewen A, 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 236-46.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680-5.
- Lan P, Li W, Wen T, Schmidt W, 2012. Quantitative phosphoproteome profiling of iron-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant physiol* **159**, 403-17.
- Landsberg E, 1986. Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response mechanism of *Capsicum annuum* L. *Plant physiol* **82**, 511-7.
- Laulhere J, Briat J, 1993. Iron release and uptake by plant ferritin: effects of pH, reduction and chelation. *Biochem J* **290**, 693-9.
- Lee S, An G, 2009. Over-expression of *OsIRT1* leads to increased iron and zinc accumulations in rice. *Plant Cell Environ* **32**, 408-16.
- Lendzian K, Bassham J, 1975. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1, 5-diphosphate and NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios. *BBA-Bioenergetics* **396**, 260-75.
- Li J, Wu X, Hao S, Wang X, Ling H, 2008. Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics* **8**, 2299-311.
- Li X, Zhang H, Ai Q, Liang G, Yu D, 2016. Two bHLH Transcription Factors, bHLH34 and bHLH104, Regulate Iron Homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiol* **170**, 2478-93.
- Lin X, Ye Y, Fan S, Jin C, Zheng S, 2016. Increased sucrose accumulation regulates iron-deficiency responses by promoting auxin signaling in *Arabidopsis* plants. *Plant physiol* **170**, 907-20.
- Ling H, Koch G, Bäumlein H, Ganai M, 1999. Map-based cloning of *chloronerva*, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *P Natl Acad Sci* **96**, 7098-103.
- López-Millán A, Morales F, Abadía A, Abadía J, 2000a. Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant physiol* **124**, 873-84.

- López-Millán A, Morales F, Andaluz S, *et al.*, 2000b. Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant physiol* **124**, 885-98.
- López-Millán A, Morales F, Gogorcena Y, Abadía A, Abadía J, 2009. Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *J Plant Physiol* **166**, 375-84.
- López-Millán A, Morales F, Abadía A, Abadía J, 2001. Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the organic acid metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves. *Physiol Plantarum* **112**, 31-8.
- M'sehli W, Dell'orto M, Donnini S, *et al.*, 2009. Variability of metabolic responses and antioxidant defence in two lines of *Medicago ciliaris* to Fe deficiency. *Plant Soil* **320**, 219-30.
- Ma J, Ryan P, Delhaize E, 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci* **6**, 273-8.
- Maeda I, Hikawa H, Mizoguchi T, Yagi K, 2001. Repression of starch degradation under anaerobic conditions by irregularly high levels of ATP in *Chlamydomonas* sp. MGA161. *Plant Sci* **160**, 629-34.
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus H, 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J Exp Bot* **58**, 83-102.
- Masakapalli S, Kruger N, Ratcliffe R, 2013. The metabolic flux phenotype of heterotrophic *Arabidopsis* cells reveals a complex response to changes in nitrogen supply. *Plant J* **74**, 569-82.
- Melzer E, O'leary M, 1987. Anapleurotic CO<sub>2</sub> fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. *Plant physiol* **84**, 58-60.
- Møller I, 1997. The oxidation of cytosolic NAD(P)H by external NAD(P)H dehydrogenases in the respiratory chain of plant mitochondria. *Physiol Plantarum* **100**, 85-90.
- Møller I, 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Biol* **52**, 561-91.
- Morera S, Chiadmi M, Lebras G, Lascu I, Janin J, 1995. Mechanism of phosphate transfer by nucleoside diphosphate kinase: X-ray structures of the phosphohistidine intermediate of the enzymes from *Drosophila* and *Dictyostelium*. *Biochem* **34**, 11062-70.
- Msilini N, Attia H, Bouraoui N, *et al.*, 2009. Responses of *Arabidopsis thaliana* to bicarbonate-induced iron deficiency. *Acta Physiol Plant* **31**, 849-53.

- Nee G, Aumont-Nicaise M, Zaffagnini M, Nesler S, Valerio-Lepiniec M, Issakidis-Bourguet E, 2014. Redox regulation of chloroplastic G6PDH activity by thioredoxin occurs through structural changes modifying substrate accessibility and cofactor binding. *Biochem J* **457**, 117-25.
- Noctor G, 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* **29**, 409-25.
- Nouet C, Motte P, Hanikenne M, 2011. Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci* **16**, 395-404.
- Novak B, Csikasz-Nagy A, Gyorffy B, Chen K, Tyson J, 1998. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophys Chem* **72**, 185-200.
- Novikova G, Moshkov I, Smith A, Kulaeva O, Hall M, 1999. The effect of ethylene and cytokinin on guanosine 5'-triphosphate binding and protein phosphorylation in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **208**, 239-46.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, *et al.*, 2005. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant physiol* **137**, 611-22.
- O'leary B, Park J, Plaxton W, 2011. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem J* **436**, 15-34.
- Ohwaki Y, Sugahara K, 1997. Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Plant Soil* **189**, 49-55.
- Osorio Vega N, 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Revista Facultad Nacional de Agronomia, Medellin* **60**, 3621-43.
- Otero A, 2000. NM23/nucleoside diphosphate kinase and signal transduction. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 269-75.
- Ozçelik İ, Çalık P, Çalık G, Özdamar T, 2004. Metabolic engineering of aromatic group amino acid pathway in *Bacillus subtilis* for L-phenylalanine production. *Chem Eng Sci* **59**, 5019-26.

- Pascal N, Douce R, 1993. Effect of iron deficiency on the respiration of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. *Plant physiol* **103**, 1329-38.
- Pellny T, Locato V, Vivancos P, *et al.*, 2009. Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADP-ribose) polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of *Arabidopsis* cells in culture. *Mol Plant* **2**, 442-56.
- Pereira E, Oliva M, Rosado-Souza L, *et al.*, 2013. Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Sci* **201**, 81-92.
- Perlstein D, Ge J, Ortigosa A, *et al.*, 2005. The active form of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit is a heterodimer in vitro and in vivo. *Biochem* **44**, 15366-77.
- Pham D, Blachuta B, Nichol H, Winzerling J, 2002. Ribonucleotide reductase subunits from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: cloning and expression. *Insect Biochem Molec* **32**, 1037-44.
- Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, Scholz G, Schmidt W, 2001. Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* **213**, 967-76.
- Pich A, Scholz G, 1996. Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J Exp Bot* **47**, 41-7.
- Plaxton W, 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Biol* **47**, 185-214.
- Plaxton W, Podestá F, 2006a. The functional organization and control of plant respiration. *Crit Rev Plant Sci* **25**, 159-98.
- Plaxton W, Podestá F, 2006b. The functional organization and control of plant respiration. *CRC Cr Rev Plant Sci* **25**, 159-98.
- Pollak N, Dolle C, Ziegler M, 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides-small molecules with a multitude of functions. *Biochem J* **402**, 205-18.
- Poolman M, Miguet L, Sweetlove L, Fell D, 2009. A genome-scale metabolic model of *Arabidopsis* and some of its properties. *Plant physiol* **151**, 1570-81.

- Prabu G, Thirugnanasambantham K, Mandal A, Saravanan A, 2012. Molecular cloning and characterization of nucleoside diphosphate kinase 1 cDNA in tea. *Biol Plantarum* **56**, 140-4.
- Pryke J, Ap Rees T, 1977. The pentose phosphate pathway as a source of NADPH for lignin synthesis. *Phytochemistry* **16**, 557-60.
- Rabotti G, De Nisi P, Zocchi G, 1995. Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. *Plant physiol* **107**, 1195-9.
- Rabotti G, Zocchi G, 1994. Plasma membrane-bound H<sup>+</sup>-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiol Plantarum* **90**, 779-85.
- Rademacher T, Häusler R, Hirsch H, *et al.*, 2002. An engineered phosphoenolpyruvate carboxylase redirects carbon and nitrogen flow in transgenic potato plants. *Plant J* **32**, 25-39.
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat J, Gaymard F, Cellier F, 2009. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**, 400-12.
- Rellan-Alvarez R, Andaluz S, Rodriguez-Celma J, *et al.*, 2010. Changes in the proteomic and metabolic profiles of *Beta vulgaris* root tips in response to iron deficiency and resupply. *BMC plant biol* **10**, 120.
- Reyt G, Boudouf S, Boucherez J, Gaymard F, Briat J, 2015. Iron-and ferritin-dependent reactive oxygen species distribution: impact on *Arabidopsis* root system architecture. *Mol Plant* **8**, 439-53.
- Rivoal J, Hanson A, 1993a. Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *Limonium*. *Plant physiol* **101**, 553-60.
- Rivoal J, Hanson A. The overexpression of Lactate-dehydrogenase in transgenic tomato roots supports the davies hypothesis *Proceedings of the Plant physiol*, 1993b: Amer Soc Plant Physiologists 15501 Monona Drive, Rockville, MD 20855 38-.
- Rivoal J, Trzos S, Gage D, Plaxton W, Turpin D, 2001. Two unrelated phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides physically interact in the high molecular mass isoforms of this enzyme in the unicellular green alga *Selenastrum minutum*. *J Biol Chem* **276**, 12588-97.

- Robinson J, 2000. Dark and Daylight Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in the Leaves of Nitrogen-Limited Spinach and Soybean Plants. *Int J Plant Sci* **161**, 651-7.
- Robinson N, Procter C, Connolly E, Guerinot M, 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**, 694-7.
- Rodríguez-Celma J, Lattanzio G, Grusak M, Abadía A, Abadía J, Lopez-Millan A, 2011. Root responses of *Medicago truncatula* plants grown in two different iron deficiency conditions: changes in root protein profile and riboflavin biosynthesis. *J Proteome Res* **10**, 2590-601.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J, 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 675-709.
- Römheld V, Marschner H, 1983. Mechanism of iron uptake by peanut plants I.  $\text{Fe}^{3+}$  reduction, chelate splitting, and release of phenolics. *Plant physiol* **71**, 949-54.
- Römheld V, Müller C, Marschner H, 1984. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant physiol* **76**, 603-6.
- Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Dufourc E, Raymond P, Rolin D, 2002. The metabolic architecture of plant cells stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *J Biol Chem* **277**, 43948-60.
- Rudrappa T, Czymmek K, Paré P, Bais H, 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiol* **148**, 1547-56.
- Ruelland E, Miginiac-Maslow M, 1999. Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Sci* **4**, 136-41.
- Salon C, Raymond P, Pradet A, 1988. Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *J Biol Chem* **263**, 12278-87.
- Sanvisens N, Bañó M, Huang M, Puig S, 2011. Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency. *Mol Cell* **44**, 759-69.
- Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu B, Mori S, Kitahara T, Von Wiren N, 2004. ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem* **279**, 9091-6.

- Schagerlof U, Wilson G, Hebert H, Al-Karadaghi S, Hagerhall C, 2006. Transmembrane topology of FRO2, a ferric chelate reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **62**, 215-21.
- Schmidt W, 2003a. Iron homeostasis in plants: sensing and signaling pathways. *J Plant Nutr* **26**, 2211-30.
- Schmidt W, 2003b. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci* **8**, 188-93.
- Schmidt W, Bartels M, 1996. Formation of root epidermal transfer cells in *Plantago*. *Plant physiol* **110**, 217-25.
- Schmidt W, Schuck C, 1996. Pyridine nucleotide pool size changes in iron-deficient *Plantago lanceolata* roots during reduction of external oxidants. *Physiol Plantarum* **98**, 215-21.
- Schwender J, Shachar-Hill Y, Ohlrogge J, 2006. Mitochondrial metabolism in developing embryos of *Brassica napus*. *J Biol Chem* **281**, 34040-7.
- Severance S, Chakraborty S, Kosman D, 2004. The Ftr1p iron permease in the yeast plasma membrane: orientation, topology and structure-function relationships. *Biochem J* **380**, 487-96.
- Sijmons P, Bienfait H, 1983. Source of electrons for extracellular Fe<sup>3+</sup> reduction in iron-deficient bean roots. *Physiol Plantarum* **59**, 409-15.
- Sijmons P, Lanfermeijer F, De Boer A, Prins H, Bienfait H, 1984a. Depolarization of cell membrane potential during trans-plasma membrane electron transfer to extracellular electron acceptors in iron-deficient roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant physiol* **76**, 943-6.
- Sijmons P, Van Den Briel W, Bienfait H, 1984b. Cytosolic NADPH is the electron donor for extracellular Fe<sup>3+</sup> reduction in iron-deficient bean roots. *Plant physiol* **75**, 219-21.
- Simcox P, Dennis D, 1978. 6-Phosphogluconate dehydrogenase isoenzymes from the developing endosperm of *Ricinus communis* L. *Plant physiol* **62**, 287-90.
- Spence M, Henzl M, Lammers P, 1991. The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Mol Biol* **17**, 499-504.
- Spielbauer G, Li L, Römisch-Margl L, *et al.*, 2013. Chloroplast-localized 6-phosphogluconate dehydrogenase is critical for maize endosperm starch accumulation. *J Exp Bot* **64**, 2231-42.



- Stearman R, Yuan D, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner R, Dancis A, 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**, 1552-7.
- Stephan U, 2002. Intra-and intercellular iron trafficking and subcellular compartmentation within roots. *Plant Soil* **241**, 19-25.
- Stubbe J, Van Der Donk W, 1995. Ribonucleotide reductases: radical enzymes with suicidal tendencies. *Chem Biol* **2**, 793-801.
- Summers J, Ratcliffe R, Jackson M, 2000. Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus*: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. *J Exp Bot* **51**, 1413-22.
- Sunda W, Huntsman S, 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature* **390**, 389-92.
- Sweetlove L, Beard K, Nunes-Nesi A, Fernie A, Ratcliffe R, 2010. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci* **15**, 462-70.
- Sweetlove L, Heazlewood J, Herald V, *et al.*, 2002. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J* **32**, 891-904.
- Thelander L, Reichard P, 1979. Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* **48**, 133-58.
- Thimm O, Essigmann B, Kloska S, Altmann T, Buckhout T, 2001. Response of *Arabidopsis* to Iron Deficiency Stress as Revealed by Microarray Analysis. *Plant physiol* **127**, 1030-43.
- Thoirion S, Pascal N, Briat J, 1997. Impact of iron deficiency and iron re-supply during the early stages of vegetative development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Environ* **20**, 1051-60.
- Thomas D, Cherest H, Surdin-Kerjan Y, 1991. Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur. *EMBO J* **10**, 547.
- Tiffin L, 1966. Iron translocation I. Plant culture, exudate sampling, iron-citrate analysis. *Plant physiol* **41**, 510.
- Vidal J, Chollet R, 1997. Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> PEP carboxylase. *Trends Plant Sci* **2**, 230-7.
- Viets Jr F, 1962. Micronutrient availability, chemistry and availability of micronutrients in soils. *J Agr Food Chem* **10**, 174-8.

- Vigani G, 2012. Discovering the role of mitochondria in the iron deficiency-induced metabolic responses of plants. *J Plant Physiol* **169**, 1-11.
- Vigani G, Maffi D, Zocchi G, 2009. Iron availability affects the function of mitochondria in cucumber roots. *New Phytol* **182**, 127-36.
- Vigani G, Zocchi G, 2009. The fate and the role of mitochondria in Fe-deficient roots of Strategy I plants. *Plant Signal Behav* **4**, 375-9.
- Vigani G, Zocchi G, 2010. Effect of Fe deficiency on mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in cucumber roots. *J Plant Physiol* **167**, 666-9.
- Vigani G, Zocchi G, Bashir K, Philippar K, Briat J-F, 2013. Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends Plant Sci* **18**, 305-11.
- Von Wirén N, Klair S, Bansal S, *et al.*, 1999. Nicotianamine chelates both Fe<sup>3+</sup> and Fe<sup>2+</sup>. Implications for metal transport in plants. *Plant physiol* **119**, 1107-14.
- Wakao S, Benning C, 2005. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis. *Plant J* **41**, 243-56.
- Wang C, Liu Z, 2006. Arabidopsis ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell* **18**, 350-65.
- Wang H, Ma F, Cheng L, 2010. Metabolism of organic acids, nitrogen and amino acids in chlorotic leaves of ‘Honeycrisp’ apple (*Malus domestica* Borkh) with excessive accumulation of carbohydrates. *Planta* **232**, 511-22.
- Wedding R, Black M, Meyer C, 1990. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by malate. *Plant physiol* **92**, 456-61.
- Weger H, Espie G, 2000. Ferric reduction by iron-limited *Chlamydomonas* cells interacts with both photosynthesis and respiration. *Planta* **210**, 775-81.
- Wenderoth I, Scheibe R, Von Schaewen A, 1997. Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* **272**, 26985-90.
- Williams T, Miguet L, Masakapalli S, Kruger N, Sweetlove L, Ratcliffe R, 2008. Metabolic network fluxes in heterotrophic *Arabidopsis* cells: stability of the flux distribution under different oxygenation conditions. *Plant physiol* **148**, 704-18.

- Wintz H, Fox T, Wu Y, *et al.*, 2003. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 47644-53.
- Zimmermann S, Baumann A, Jaekel K, Marbach I, Engelberg D, Frohnmeier H, 1999. UV-responsive genes of *Arabidopsis* revealed by similarity to the Gcn4-mediated UV response in yeast. *J Biol Chem* **274**, 17017-24.
- Zocchi G, Cocucci S, 1990. Fe uptake mechanism in Fe-efficient cucumber roots. *Plant physiol* **92**, 908-11.
- Zocchi G, De Nisi P, Dell'orto M, Espen L, Gallina P, 2007. Iron deficiency differently affects metabolic responses in soybean roots. *J Exp Bot* **58**, 993-1000.

# Annexe 1

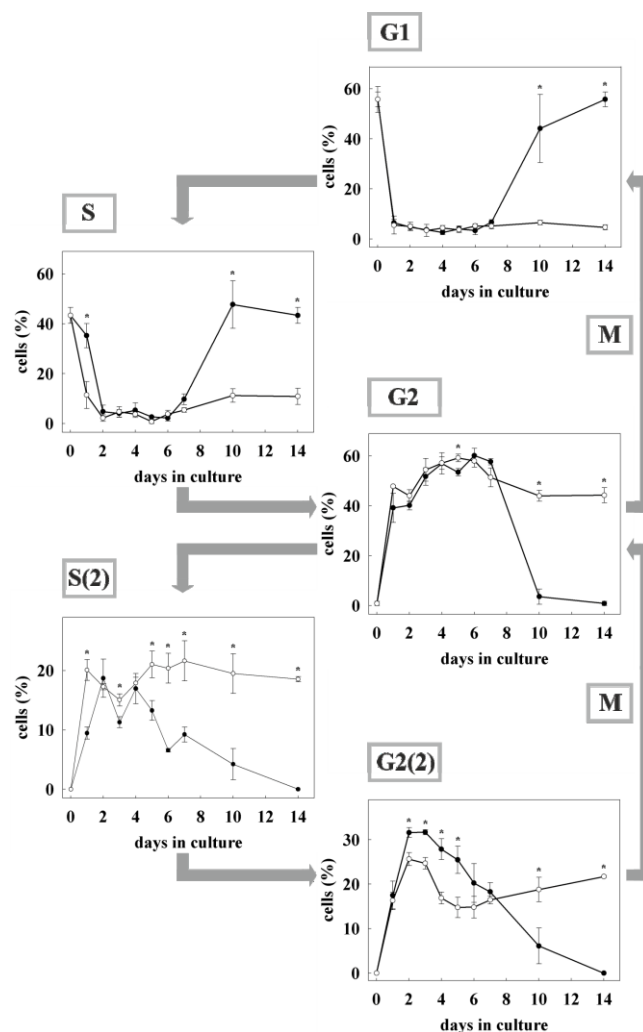


Figure Supplémentaire 1. Quantification des cellules de *S. tuberosum* présentes dans les différentes phases du cycle cellulaire lors d'une analyse par cytométrie en flux. Les cultures étaient faites en présence (ronds noirs) ou absence (ronds blancs) de Fe. La proportion de cellules dans chaque phase cellulaire a été mesurée après coloration à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules dans une culture cellulaire. Les phases G1, S et G2 sont pour un cycle cellulaire normal. Les phases S (2) et G2(2) correspondent à un cycle d'endoréplication. Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux traitements (test t,  $P < 0,05$ ). (Résultats obtenus par E. Auslender et J. Rivoal, en préparation pour publication).

